UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

Unidad Regional Los Mochis

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

T E S I S:

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD DE *Colletotrichum coccodes*, ASOCIADO AL PAÑO DE LA PAPA, SU PATOGENICIDAD EN TOMATE Y CHILE, Y SU CONTROL MEDIANTE *Bacillus cereus* Y FUNGICIDAS SINTÉTICOS.

PRESENTA:

JESÚS OTHONIEL MARRUFO RUIZ

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN FITOPATOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

Director de Tesis:

Dr. Rubén Félix Gastélum

Directora de tesis:

Dra. Rosa María Longoria Espinoza

Los Mochis, Sinaloa, México a diciembre de 2021.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

VICERRECTORÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Asunto: **carta conclusión de tesis para opción de grado**.
Los Mochis Sinaloa, 12 de diciembre 2021

Dra. Karla Mariela Sandoval Cota
Jefa del Departamento de Investigación y Posgrado Unidad Regional Los Mochis
Presente.-

Habiendo constatado que las observaciones realizadas por el comité revisor han sido atendidas en la obra, el suscrito en la calidad de director de tesis, doy por concluido el trabajo siguiente:

Nombre del maestrante**: Jesús Othoniel Marrufo Ruiz** Matrícula**: 19021525**

Nombre de Tesis: "**CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD DE *Colletotrichum coccodes*, ASOCIADO AL PAÑO DE LA PAPA, SU PATOGENICIDAD EN TOMATE Y CHILE, Y SU CONTROL MEDIANTE *Bacillus cereus* Y FUNGICIDAS SINTÉTICOS".**

Nombre del Programa Educativo: **Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente.**

A t e n t a m e n t e.

Dr. Rubén Félix Gastélum
Director de Tesis

El presente trabajo de investigación titulado “Confirmación de la identidad de *Colletotrichum coccodes*, asociado al paño de la papa, su patogenicidad en tomate y chile, y su control mediante *Bacillus cereus* y fungicidas sintéticos**”.** realizado por el **Ing. Jesús Othoniel Marrufo Ruiz** con matrícula **19021525**, dirigido por los integrantes del Comité de Tesis abajo indicados, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial, para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

COMITÉ DE TESIS:

Dr. Rubén Félix Gastélum
Director de Tesis

Dra. Rosa María Longoria Espinoza
Directora de Tesis

Dr. Hugo Beltrán Peña
Asesor de Tesis

Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez
Asesora de Tesis

Los Mochis, Sinaloa, México a diciembre de 2021.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Los Mochis, Sinaloa, el día13 del mes agosto del año 2021, quien suscribe Jesús Othoniel Marrufo Ruiz alumno del Programa Educativo de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente (Registro CONACyT 004128) con número de matrícula 19021525, de la Unidad Regional Los Mochis manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Rubén Félix Gastélum y Dra. Rosa María Longoria Espinoza y cedo los derechos del trabajo titulado "Confirmación de la identidad de *Colletotrichum coccodes*, asociado al paño de la papa, su patogenicidad en tomate y chile, y su control mediante *Bacillus cereus* y fungicidas sintéticos", a la Universidad Autónoma de Occidente para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jesús Othoniel Marrufo Ruiz

El trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Fitopatología y Microbiología de la Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Sinaloa bajo la dirección del Dr. Rubén Félix Gastélum.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, doy gracias a Dios por proveerme de coraje, sabiduría, pasión y sensatez para superar cada uno de los obstáculos que fueron surgiendo en mi camino y de esa manera poder cumplir cada una de mis metas y objetivos.

Quiero agradecer a mi director, el **Dr. Rubén Félix Gastélum** por ser una persona invaluable, amigo, compañero y maestro, por enseñarme con paciencia y sabiduría muchas cosas de gran valor para mi vida profesional y por brindarme su apoyo incondicional y consejos durante este proyecto de vida, darle gracias también por dirigirme de manera exitosa compartiendo esa experiencia que ha adquirido durante toda su trayectoria, no solo con el objetivo de realizar este proyecto si no, el de formar recurso humano con buenas habilidades y capacidades para resolver problemas y obstáculos que se presentan día a día en el campo de la ciencia y profesional. Este proceso no hubiese sido posible sin su valiosa colaboración y ayuda muchas gracias. A mi directora, la **Dra. Rosa María Longoria Espinoza** por la dirección invaluable de la planeación, ejecución y culminación de esta investigación. Y a mis asesores el **Dr. Hugo Beltrán Peña** y a la **Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez** por las aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación.

Agradecer también al programa y equipo que integra al posgrado de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente (MFMA) de la Universidad Autónoma de Occidente Unidad Regional Los Mochis (UAdeO) por haberme otorgado la oportunidad de ser parte de la generación 2019-2021. Y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **(CONACYT)**, por la beca otorgada durante mi programa de estudios de maestría.

Agradecer también a los profesores de los cuales me siento muy orgulloso de haber sido su alumno, los cuales aportaron con mucho entusiasmo un amplio conocimiento para formarme como un excelente profesionista y persona; **Dr. Rubén, Dr. Bardo, Dr. Juan, Dr. Hugo, Dr. Damián, Dra. Rosa María, Dra. Arlene, Dra. Karla Yeriana y a la MC. Cecilia.** Gracias por sus experiencias y anécdotas.

Quiero agradecer a la agrícola Ocalle S.A. de C.V. por haberme permitido mejorar mi desarrollo profesional. Por la confianza de cada uno de los lideres y representantes, también por las responsabilidades asignadas y el hecho de valorar enormemente el esfuerzo realizado para alcanzar con éxito los objetivos propuestos. Muchas gracias.

Quiero agradecer de manera muy especial al Ing. Oscar Olivar Contreras, quien siempre estuvo dispuesto a enseñarme y pulir cada una de mis cualidades y defectos, aprovechando cada oportunidad para ser de mi una mejor persona, gracias por todos esos consejos he historias que me alcanzaron y me llevaron a ser quien soy en mi carrera, con cada una de las experiencias que con una sonrisa en el rostro me regalo, jamas olvidare la gran persona que fue, me siento dichoso por haber compartido grandes momentos, ha dejado recuerdos inolvidables, valiosas lecciones de vida y un gran conocimiento que guardare como un verdadero tesoro, fue un excelente jefe, amigo y compañero aunque ha partido de este mundo, siempre guardare su recuerdo con mucho cariño, un abrazo hasta el cielo.

Quiero agradecer a mis padres y hermanos por el apoyo incondicional y el amor que me han regalado para salir adelante. Y también le doy gracias a mi esposa Nuvia Giselle Villanueva Benítez por el cariño, comprensión, paciencia y apoyo incondicional en el recorrido de esta bonita etapa, haciendo las horas de trabajo más cortas disfrutando de su cálida compañía.

Gracias por todo.

DEDICATORIA

A mis padres Jesús María Marrufo Cervantes y Leticia Isabel Ruiz Figueroa por haberme regalado un amor infinito una educación y sobre todo lo más valioso la vida.

A mis hermanos Zendy Michelinne Marrufo Ruiz y Jonathan Marrufo Ruiz por su cariño y apoyo.

A mi amiga y compañera de vida Giselle.

“NADIE ES TAN PEQUEÑO QUE NO PUEDA DAR, NI TAN GRANDE QUE NO NECESITE RECIBIR”

Jesús Othoniel Marrufo Ruiz

RESUMEN

La papa, tomate y chile son hortalizas de gran importancia a nivel mundial y nacional. Sinaloa resalta los altos niveles de producción de estas hortalizas a nivel nacional. En ciclos agrícolas recientes el paño de la papa se ha constituido como una de las enfermedades más importantes en Sinaloa. En el presente trabajo se confirmó la identidad mediante estudios morfológicos y moleculares del hongo *Colletotrichum coccodes* y se demostró su patogenicidad de tres aislados del hongo en papa var. Fianna donde causaron los síntomas típicos de paño de la papa en los tubérculos y pudrición de tallos en las plantas cuando estas llegaron a la etapa fenológica de llenado de tubérculos y cosecha. Paralelamente, se realizaron pruebas de patogenicidad de los mismos aislados en tomate híbrido DRD 8551 y chile híbrido Plata, donde no se observaron síntomas de amarillamiento y marchitez en las plantas inoculadas, pero si se observaron acérvulos en el área cortical de la raíz de ambas solanáceas. Las pruebas de efectividad biológica *in vitro* indicaron que un aislado representativo de *C. coccodes* fue altamente sensitivo a la dosis de 10 y 100.0 ppm del fungicida procloraz y a las dosis de 5 y 10 ppm de propiconazol, así como a las dosis altas (500 y 1000 ppm) de hidróxido cúprico. Mientras que dicho aislado fue moderadamente sensible al metil-tiofanato y al fluoxastrobin. En el mismo ensayo de efectividad biológica de la bacteria *Bacillus cereus* también mostró inhibición *in vitro* de *C. coccodes*, lo cual fue más evidente cuando la bacteria se utilizó a partir de cultivos de 48 h, que cuando se utilizó en formulación en polvo humectable.

Palabras clave: Papa, tomate, chile, Patogenicidad, *Colletotrichum coccodes.*

ABSTRACT

The potato, tomato and pepper are vegetables of great importance worldwide and nationally. Sinaloa highlights the high levels of production of these vegetables nationwide. In recent agricultural cycles, potato cloth has become one of the most important diseases in Sinaloa. In the present work, the identity of the fungus *Colletotrichum coccodes* was confirmed by morphological and molecular studies and its pathogenicity of three isolates of the fungus in potato var. Fianna where they caused the typical symptoms of potato cloth on tubers and stem rot on plants when they reached the phenological stage of tuber filling and harvesting. At the same time, pathogenicity tests were carried out on the same isolated tests on hybrid tomato DRD 8551 and hybrid pepper Plata, where no symptoms of yellowing and wilting were observed in the inoculated plants, but there were observed cervules in the cortical area of the root of both nightshades. *In vitro* biological effectiveness tests indicated that a representative isolate of *C. coccodes* was highly sensitive to doses of 10.0 and 100.0 ppm of the fungicide prochloraz and to doses of 5.0 and 10.0 ppm of propiconazole, as well as to high doses (500.0 and 1000.0 ppm) of cupric hydroxide. While said isolate was moderately sensitive to methylthiophanate and fluoxastrobin. In the same biological effectiveness test, the bacterium *Bacillus cereus* also showed *in vitro* inhibition of *C. cocodes*, which was more evident when the bacterium was used from 48-hour cultures, than when it was used in a wettable powder formulation.

Keywords: Potato, tomato, pepper, Pathogenicity, *Colletotrichum coccodes.*

ÍNDICE

RESUMEN 1
ABSTRACT 2
ÍNDICE DE CUADROS 6
ÍNDICE DE FIGURAS 7
I. INTRODUCCIÓN GENERAL 10
II. REVISIÓN DE LITERATURA 13
2.1. Papa (*Solanum tuberosum* L.) 13
2.1.1. Origen y distribución 13
2.1.2. Características morfológicas 13
2.1.3. Taxonomía de la papa 14
2.1.4. Producción mundial y nacional 14
2.1.5. Enfermedades 14
2.2. Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) 16
2.2.1. Origen y distribución 16
2.2.2. Características morfológicas 16
2.2.3. La taxonomía de tomate 17
2.2.4. Producción mundial y nacional 17
2.2.5. Enfermedades 17
2.3. Chile (*Capsicum annuum* L.) 19
2.3.1. Origen y distribución 19
2.3.2. Características morfológicas 19
2.3.3. La taxonomía de chile 19
2.3.4. Producción mundial y nacional 20
2.3.5. Enfermedades 20
2.4. Paño de la papa por *Colletotrichum coccodes* (Wallr) S. Hughes 21
2.4.1. Importancia y distribución 21
2.4.2. Agente causal del paño de la papa 22
2.4.3. Clasificación taxonómica 22
2.4.4. Síntomas del paño de la papa 22

2.4.5. Ciclo de vida 24
2.4.6. Proceso de infección del paño de la papa 25
2.4.7. Efecto de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de la enfermedad 26
2.4.8. Uso de cultivares tolerantes 26
2.4.9. Control cultural 26
2.4.10. Control biológico de la enfermedad 27
2.4.11. Control químico 27
2.4.12. Control postcosecha 27
III. JUSTIFICACIÓN 28
IV. HIPÓTESIS 29
V. OBJETIVOS 30
5.1. OBJETIVO GENERAL 30
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS 31
6.1. Purificación y conservación de aislados fúngicos 31
6.2. Caracterización morfológica de aislados fúngicos 31
6.3. Caracterización molecular 32
6.3.1. Extracción de ADN genómico de los aislados 32
6.3.2. Electroforesis 33
6.3.3. Amplificación de ADN 33
6.3.4. Secuenciación 34
6.3.5. Análisis filogenético 34
6.4. Experimento de invernadero 35
6.4.1. Tratamiento del suelo con calor húmedo 35
6.5. Pruebas de patogenicidad 36
6.5.1. Preparación de inoculó 36
6.5.3. Evaluación de patogenicidad en plantas de papa, tomate y chile. 37
6.6. Efectividad biológica *in vitro* de fungicidas 38
6.7. Determinación de efectividad biológica *in vitro* de *Bacillus cereus* contra aislados de *Colletotrichum coccodes* 38

6.8. Análisis estadístico de datos 39
VII. RESULTADOS 41
7.1. Características fenotípicas de aislados de *Colletotrichum* y morfometría de los conidios 41
7.2 Identificación molecular 44
7.2.1. Amplificación por PCR de regiones conservadas de eucariontes 44
7.2.2. Análisis filogenético 46
7.3 Pruebas de patogenicidad en papa 48
7.3.1 Evaluación de patogenicidad de aislados de *Colletotrichum coccodes* en plantas de papa 49
7.4. Evaluación de patogenicidad de aislados de *Colletotrichum coccodes* en plantas de tomate. 51
7.4.1. Peso fresco de follaje 51
7.4.2. Presencia de acérvulos en raíces 52
7.5. Evaluación de patogenicidad de aislados de *Colletotrichum coccodes* en plantas de chile 53
7.5.1. Peso fresco de follaje y raíz 53
7.5.2. Presencia de acérvulos en raíces 55
7.6. Efectividad biológica *in vitro* de fungicidas 56
7.6.1. Efectividad biológica contra el aislado 1C 56
7.7. Ensayo de antagonismo de *Bacillus cereus* contra *Colletotrichum coccodes* 61
VIII. DISCUSION 63
IX. CONCLUSIÓN 66
X. BIBLIOGRAFÍA 67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características culturales y morfológicas de tres aislados de *Colletotrichum* obtenidos de tubérculos con síntomas de paño de la papa en lotes comerciales de Sinaloa……..…..……41

Cuadro 2. Características morfométricas de conidios de tres aislados de *Colletotrichum* obtenidos a partir de tubérculos con síntomas del paño de la papa desarrolladas en un medio de cultivo PDA……43

Cuadro 3. Patogenicidad de tres aislados de *Colletotrichum coccodes* en tubérculos de papa variedad Fianna……...49

Cuadro 4. Severidad de los aislados de *Colletotrichum coccodes* en tallos de papa variedad Fianna en Ahome, Sinaloa……50

Cuadro 5. Efecto de la severidad de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes* en el peso fresco del follaje de tomate DRD 8551……...51

Cuadro 6. Efecto de la severidad de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes* en el peso fresco de raíz en tomate……..52

Cuadro 7. Severidad de los aislados de *Colletotrichum coccodes* en raíz de tomate híbrido DRD 8551 en Ahome, Sinaloa……52

Cuadro 8. Efecto de la severidad de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes* en el peso fresco del follaje del chile híbrido plata……54

Cuadro 9. Efecto de la severidad de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes* en el peso fresco de raíz de chile híbrido plata……54

Cuadro 10. Severidad de los aislados de *Colletotrichum coccodes* en raíz de chile híbrido plata en Ahome, Sinaloa……..55

Cuadro 11. Inhibición *in vitro* de *Colletotrichum coccodes* aislado 1C por varias dosis de cinco fungicidas……..58

Cuadro 12. Inhibición *in vitro* de *Bacillus cereus* contra el aislado 1C de *Colletotrichum coccodes*. ……62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas causados por *Colletotrichum coccodes* en papa A) tallo de la variedad Fianna con presencia de acérvulos, B) tubérculos con presencia de acérvulos en el estolón, C) tubérculo con síntomas del paño de la papa, D) acérvulos con setas y conidios en masa E) crecimiento colonial de *C. coccodes* en medio de cultivo PDA……..……23

Figura 2. Ciclo de vida de *Colletotrichum coccodes*……..……25

Figura 3. A) Tonel para generar calor húmedo, B) macetas de 25 cm de diámetro, con suelo agrícola, tratado con calor húmedo. …….……35

Figura 4. Colonias de aislados A) 1C, B) 1.1C y C) 3C de *Colletotrichum* obtenidas de tubérculos con síntomas de paño de la papa, desarrolladas en PDA después de 10 días de incubación en oscuridad continua a 25 °C…….…..42

Figura 5. Conidios de aislados A) 1C, B) 1.1C y C) 3C de *Colletotrichum* formados en medio de cultivo PDA después de 10 días de incubación a 25 ºC en oscuridad continua. Microscopio Axio Imager M2. Escala = 20 µm….……42

Figura 6. Gel de agarosa 1% con amplificación de tres muestras de *Colletotrichum* provenientes de tubérculos con síntomas de paño de la papa infectados, la línea M muestra el marcador de peso molecular de 1kb en aislados 1C, 1.1C y 3C se observó una banda con fragmentos de 500 a 600 pb……44

Figura 7. Gel de electroforesis en agarosa al 1% con amplificación de tres muestras de *Colletotrichum* para el gen gliceraldheido-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y actina ACT512F/ACT783R a las 300 pb. En la línea M se encuentra el marcador de peso molecular 1kb, el control negativo no amplifico y se indica en la línea (-)……..45

Figura 8. Árbol filogenético de tres aislados de *Colletotrichum coccodes* obtenidos de tubérculos con síntomas de paño de la papa, del municipio de Ahome. Análisis de máxima verosimilitud mediante búsqueda heurística con las secuencias concatenadas de los genes GPD e ITS4/ITS5. En negritas se muestran los aislados evaluados en esta investigación. Los valores bootstrap se muestran como porcentaje en los nodos. La escala representa el promedio……...47

Figura 9. Lesiones necróticas típicas del paño de la papa en tubérculos causados por los aislados de *Colletotrichum coccodes* A) aislado 1C; B) aislado 1.1C, C) aislado 3C y D) tubérculo sano cosechado de plantas testigo sin inoculación……..48

Figura 10. Prueba de patogenicidad en: A) plantas de papa var. Fianna, B) tallo de papa var. Fianna con presencia de acérvulos causados por los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes*……50

Figura 11. Prueba de patogenicidad en: A) plantas de tomate híbrido DRD 8551, B) raíz de tomate híbrido DRD 8551 con presencia de acérvulos causados por los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes*……53

Figura 12. Prueba de patogenicidad en: A) plantas de chile híbrido plata, B) raíz de chile híbrido planta con acérvulos del hongo causados por los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes*……56

Figura 13. Efectividad biológica del fungicida procloraz sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 0.1 ppm. C) 0.5 ppm. D) 1 ppm. E) 10 ppm. F) 100 ppm……59

Figura 14. Efectividad biológica del fungicida propiconazol sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 1 ppm. C) 2 ppm. D) 3 ppm. E) 5 ppm. F) 10 ppm……..59

Figura 15. Efectividad biológica del fungicida metil-tiofanato sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 100 ppm. C) 150 ppm. D) 200 ppm. E) 300 ppm. F) 500 ppm……..60

Figura 16. Efectividad biológica del fungicida fluoxastrobin sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 1 ppm. C) 5 ppm. D) 10 ppm. E) 100 ppm. F) 300 ppm……..60

Figura 17. Efectividad biológica del fungicida hidróxido cúprico sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 100 ppm. C) 300 ppm. D) 400 ppm. E) 500 ppm. F) 1000 ppm……..61

Figura 18. Efectividad biológica de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum coccodes*. A) crecimiento micelial sin bacteria, B) suspensión bacteriana *B. cereus*, C) polvo humectable sin bacteria y D) *B. cereus* + polvo humectable……...……...……62

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo con mayor producción a nivel mundial. En México la papa se siembra en 22 estados, en Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Jalisco, México, Nuevo León, Puebla, Sinaloa, Sonora, y Veracruz se concentra el 93% de su produccion. Los productores mayoritarios son Sinaloa y Sonora, ya que en el 2017 el volumen de las cosechas generó un ingreso de 4,685 millones de pesos. Cabe mencionar que Sinaloa representa un 20% de la producción nacional y la superficie sembrada en el 2020, fue de 13,250 ha, cosechando el 100% (SIAP, 2020).

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es originario del oeste de America del sur y es una de las hortalizas de mayor importancia a nivel global, la cual pertenece a la familia de las Solanáceas (Peralta *et al*., 2006). Cabe mencionar que este cultivo representa un 36% de la superficie sembrada en el país y los estados que lo producen son: Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sonora y Sinaloa. (SIAP, 2020). Por otra parte, Sinaloa en el 2020 sembró 10,369 ha de tomate y cosechó el 100% de la superficie sembrada (SIAP, 2020).

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las especies hortícolas más importantes debido a la alta cantidad de hectáreas sembradas a nivel mundial y en México tiene un alto impacto económico por su alto consumo y rentabilidad (FAO, 2008). Por otro lado, el país tiene más del 69% de la superficie de siembra, la cual está concentrada en Chihuahua, Jalisco, San Luis Potosí, Sinaloa y Zacatecas (SIAP, 2020). Durante el 2020 se sembraron 14,438 ha de chile, pero se cosechó solo el 99.6% de dicha superficie y se asume que el 0.4% del área perdida durante el ciclo agrícola se debe a factores bióticos y abióticos (SIAP, 2020).

Las hortalizas son cultivos de alto valor comercial que durante sus ciclos se ven afectadas por una alta gama de enfermedades de origen viral, bacteriano y fungoso como marchitez (*Fusarium* spp.), costra negra (*Rhizoctonia* spp.), tizón temprano (*Alternaria solani)* (Cuesta *et al*., 2014; García *et al*., 2018). La antracnosis o paño de la papa es de suma importancia para cultivos agrícolas de papa, tomate y chile (Belov *et al.,* 2017; Jamiolkowska *et al*., 2018; Pérez *et al*., 2019).

La antracnosis de las solanáceas (denominada comúnmente paño de la papa en Sinaloa) es causado por *Colletotrichum coccodes* (Wallr), una de las enfermedades más importantes a nivel mundial, ya que afecta cultivos de papa, tomate y chile (SENASICA, 2019); su incidencia ha aumentado en hortalizas, frutas, cereales, plantas herbáceas, maderables y ornamentales, en zonas tropicales y templadas (Udayanga *et al*., 2013; Rojo *et al*., 2017; Jamiolkowska *et al*., 2018). Esta enfermedad puede generar reducciones significativas del rendimiento hasta de un 30% de acuerdo a la virulencia del patógeno y las condiciones ambientales favorables (Tsror *et al*., 1999).

Colletotrichum coccodes ha sido reportado en países como Inglaterra y Escocia donde evaluaron la interacción entre la resistencia de los cultivares y la densidad del inóculo en el suelo (Brierley *et al*., 2014). Se mostró síntomas causados por el paño en papa en los cultivos de Turquía (Cakir *et al*., 2019). A su vez en México, el patógeno fue consignado en tomate manifestando la enfermedad de antracnosis (Nieto *et al*., 2019). Por otro lado, en la India se reportan plantas de chile infectadas por este hongo (Sharma *et al*., 2011) al igual que en cultivos de papa en México fue reportado el fitopatógeno en una hortaliza de importancia agrícola como la papa (Pérez *et al*., 2019).

El paño de la papa se ha incrementado debido al aumento de las papas para mercado fresco, lo que ha llevado a los productores a lavar los tubérculos para exponer la calidad y apariencia, pero existen algunos patógenos de importancia que afectan de forma directa en la piel de los tubérculos como la costra negra (*Rhizoctonia solani),* marchitez (*Verticillium dahliae*) y paño de la papa (*C. coccodes*). Cada una de estas enfermedades se consideraba de poca importancia, pero ahora si cuentan con un efecto directo sobre la calidad de las papas (Lees y Hilton, 2003; Woodhall *et al*. 2007; Alkher *et al*., 2009).

El fitopatógeno se disemina a través del salpique de agua de lluvia y el viento; tiene la capacidad dispersarse en la semilla contaminada, plántulas que provienen de suelo o sustrato infectado, frutos enfermos y tubérculos colonizados (Andrivon *et al*., 1998; Byrne *et al*., 1998: Dillard y Cobb, 1998; Lees y Hilton 2003; Pasche *et al*., 2010; Ben y Tsror 2009). Existen reportes que muestran que el inóculo transmitido por el suelo es de mayor importancia que el transmitido por la semilla (Nitzan *et al*., 2008; Lees *et al*., 2010). El hongo sobrevive en abundantes esclerocios que se producen en tallos, raíces, estolones y tubérculos infectados; con frecuencia se le consideraba una enfermedad menor, sin embargo, su importancia se ha incrementado por la demanda de tubérculos con buen aspecto y alta calidad (Jellis y Taylor, 1974; Dillar, 1992; Lees y Hilton, 2003). Este patógeno se manifiesta a través de lesiones semicirculares y hundimientos en forma de anillos concéntricos (Cai *et al*., 2009).

Para controlar la enfermedad causada por *C. coccodes*, se requiere que los productores implementen un sistema de manejo integrado, donde se integren diferentes recursos, como la rotación de cultivos, barbechos con arado de vertedera, buen drenaje, solarización, eliminación de maleza y uso de tubérculo semilla certificada (Denner *et al*., 2000; Than *et al*., 2008; Saxena *et al*., 2016). En el manejo se debe incluir un diagnóstico, evaluación de riesgos, el uso de fungicidas sintéticos que ayuden a una reducción de inóculo inicial y al éxito en la sustentabilidad agrícola (Landero *et al*., 2016). En años recientes, la incidencia del paño en papa para consumo en fresco ha alcanzado el 16% de incidencia en el norte de Sinaloa, se repercutio en la calidad de la cosecha en siembras tardías. Aun cuando la enfermedad no se ha consignado en tomate y chile en la región de Sinaloa, existen publicaciones en Francia, Estados Unidos, Brasil, Israel y la India de este fitopatógeno, donde se reporta que ataca a estos cultivos. (Tozze *et al*., 2006; Alkan *et al*., 2008; Sharma *et al*., 2011).

Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron: Identificar morfológica y molecularmente aislados de *C. coccodes* asociados al paño de la papa, determinar si los aislados del hongo que ocurren en papa son patogénicos en tomate y chile en condiciones de invernaderos y probar la efectividad biológica *in vitro* de fungicidas contra el hongo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Papa (*Solanum tuberosum* L.)

2.1.1. Origen y distribución

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) es originario de la Cordillera de los Andes, en la frontera de Bolivia y Perú, esta hortaliza se ha cultivado por más de 8,000 años. Esta región se encuentra a una altura de 3,800 metros sobre el nivel del mar y se ubica muy cerca del lago Titicaca, con una gran diversidad de especies de papas silvestres y cultivadas (FAO, 2008; Sahair *et al*., 2018). La papa se cultiva en países como la India, Rusia, Ucrania, Estados Unidos de América, Alemania, Bangladesh, Francia, México, pero es China el productor mayoritario. (FAOSTAT, 2019).

2.1.2. Características morfológicas

La papa dicotiledónea de la familia solanácea, posee una raíz que procede de una semilla sexual y contiene muchas raíces adventicias. Estás se encuentran con mayor abundancia en los primeros 30 cm de la superficie del suelo (Huamán, 1994). El tallo está constituido por un tallo principal, que se origina a través del tubérculo semilla. El tallo secundario se desarrolla a partir de la yema subterránea y el tallo estolonífero se manifiesta a través del estolón (Egúsquiza, 2000). Las hojas son compuestas, contienen foliolos primarios y secundario, su tamaño incrementa a medida que las hojas se alejan del nudo de inserción (Huamán, 1994).

Las flores contienen cinco sépalos, la corola cuenta con cinco pétalos que están unidos en la base, los cuales forman una superficie plana con cinco lóbulos donde el androceo presenta cinco estambres formado por filamento y antera, el gineceo tiene un pistilo constituido por un ovario súpero, bilocular, estigma y estilo. La cantidad de flores y su color es dependiente al genotipo (Sánchez, 2003). El fruto es una baya oval muy pequeña que contiene en el interior semillas sexuales, su color se diferencia entre amarillo y verde, en algunas ocasiones violeta e incluso café (Huamán, 1994).

2.1.3. Taxonomía de la papa basado en (GBIF, 2021).

Reino: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum tuberosum* L.

2.1.4. Producción mundial y nacional

En 2019, los mayores productores de papa a nivel mundial fueron: China, India, Rusia, Ucrania, Estados Unidos de América, Alemania, Bangladesh, Francia y México con 91.88, 50.19, 22.74, 20.26, 19.18, 10.60, 9.65, 8.56 y 1.78 millones de toneladas (FAOSTAT, 2019). En México, existen 22 estados productores de papa, sin embargo, el 93% de la producción nacional se concentra en Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Jalisco, México, Nuevo León, Puebla, Sinaloa, Sonora y Veracruz (SIAP, 2020).

2.1.5. Enfermedades

El cultivo de papa, durante todas sus etapas fenológicas, se encuentra limitado por diversos factores bióticos y abióticos que deterioran la calidad (Rivadeneira *et al*., 2020). Las lesiones en tubérculos pueden presentarse como manchas, agallas y/o pudriciones causadas por hongos, bacterias y nematodos, el cual distorciona su apariencia, lo que provoca el rechazo del consumidor (Fiers *et al*., 2010; 2012; García *et al*., 2018).

2.1.5.1. Enfermedades causadas por bacterias

Las principales enfermedades bacterianas que afectan a la papa son: necrosis (*Enterobacter aerogenes),* Pudrición *(Pseudomonas fluorescens),* roña común *(Streptomyces* sp.) asociado a manchas atípicas (García *et al*., 2018). La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* es uno de los factores que limitan la producción (Kumar *et al*., 2018). El cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis*) provoca pérdidas económicas (Sagcan y Turgut, 2019). Con respecto a las especies de *Pectobacterium,* estas producen la pudrición blanda en diversos cultivos (Joshi *et al*., 2016).

2.1.5.2. Enfermedades causadas por virus

Se ha reportado que existen más de 50 virus que son capaces de infectar a las papas a nivel mundial, pero solo algunos de ellos pueden causar pérdidas considerables, los virus más dañinos son (PVY) *Potato virus Y* (PLRV) *Potato leafroll virus* a nivel global. Las pérdidas causadas por estos dos virus pueden llegar a superar el 80% cuando se combinan con otros. El (PVX) *Potato virus X* está presente en muchas partes del mundo y las pérdidas causadas son del 10 a 40% en infecciones particulares, pero en combinación con (PVY) ocasiona hasta un 80% del rendimiento de tubérculos (Kreuze *et al*., 2020).

2.1.5.3. Enfermedades causadas por nematodos

Entre los fitoparásitos que influyen de forma negativa al rendimiento y la calidad, están los nematodos como *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Ditylenchus* spp., *Nacobbus* spp., las especies de *Globodera* spp., tienen un alto impacto con pérdidas en el rendimiento de hasta un 50% (Pacajes *et al*., 2002; Duceppe *et al*., 2017; Lima *et al*., 2018).

2.1.5.4. Enfermedades causadas por hongos y oomycetes

Existen enfermedades en la papa causadas por hongos y oomycetes que producen síntomas y afectaciones severas en la cantidad y la calidad de la producción. En estudios recientes se ha informado que algunas de las enfermedades más comunes que se presentan en campo son la marchitez (*Fusarium oxysporum, F. solani, F. verticillioides),* marchitez de plántula *(Rhizoctonia solani),* tizón temprano (*Alternaria solani),* antracnosis *(Colletotrichum* sp.), moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*) y tizón tardío (*Phytophthora infestans*) (Stefanczyk *et al*., 2016; Bjorsell *et al*., 2017; Kurt *et al*., 2017; García *et al*., 2018; Zhang *et al*., 2020).

2.2. Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

2.2.1. Origen y distribución

El cultivo de tomate es originario de América del Sur y fue transportado a Europa por los españoles en el siglo XVI. Este producto fue llevado a América del Norte por los europeos en el siglo XVIII (Hanssen y Lapidot, 2012). Se asume que el tomate fue domesticado en el golfo de México, en los estados de Veracruz y Puebla, una vez que fue aceptado, por los europeos, los jardineros italianos se concentraron en el mejoramiento del cultivo, hasta que formara parte de una alimentación balanceada en el país (Long, 1995; Delices *et al*., 2019). Aunque la evidencia favorece a México como el centro de domesticación mas importante del tomate, esta se cultiva en varias partes del mundo como: Turquía, Estados Unidos de América, Egipto, Italia, Irán, España y México, pero los principales productores son China y la India. (FAOSTAT, 2019).

2.2.2. Características morfológicas

La planta de tomate puede crecer de forma rastrera, semirrecta o erecta, algunas son de desarrollo indeterminado con raíces primarias, secundarias y adventicias. El tallo principal tiene un grosor de 2-4 cm en su base, su estructura consta de epidermis, corteza y su sistema interno está constituido por un cilindro vascular y tejido medular. La hoja está compuesta por foliolos con un borde dentado y la flor es regular, hipógina con más de cinco sépalos, el número de los pétalos es igual con una coloración amarilla, los estambres se alternan en los pétalos y las flores se agrupan en racimo (Jiménez y Oseas, 2017).

2.2.3. La taxonomía de tomate basado en (GBIF, 2021).

Reino: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum lycopersicum* L.

2.2.4. Producción mundial y nacional

En el 2019, los máximos productotres de tomate fueron China, la India, Turquía, Estados Unidos de América, Egipto, Italia, Irán, España y México con 62.86, 19.00, 12.84, 10.85, 6.75, 5.25, 5.24, 5.00 y 4.27 millones de toneladas, en forma respectiva (FOASTAT, 2019). En México, la producción de tomate se distribuye en 32 estados, de los cuales el 85% de la producción se concentra en Baja California, Baja California Sur, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Veracruz y Zacatecas (SIAP, 2020).

2.2.5. Enfermedades

En el cultivo de tomate algunas enfermedades como marchitez vascular por el fitopatógeno (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) producen daños superiores al 60% (Carmona *et al*., 2020). Así mismo, la enfermedad de antracnosis (*C. coccodes*) puede ocasionar pérdidas superiores al 50% (Cardona *et al*., 2008). Cabe mencionar que hay un gran número de organismos que están asociados a esta planta que pueden afectar raíces, hojas, tallos y frutos (Apodaca, *et al*., 2001; Félix y Gálvez, 2002; TM *et al*., 2018).

2.2.5.1. Enfermedades por bacterias

Las enfermedades causadas por bacterias que se han reportado con daños importantes en tomate son la podredumbre del tallo (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis)* (Caruso *et al*., 2016), cancer bacteriano (*Clavibacter michiganensis*) (Nandi *et al*., 2018) y mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* y *X. perforans* (Kizheva *et al*., 2020).

2.2.5.2. Enfermedades causadas por virus

Las enfermedades causadas por virus en tomate son: (TICV) *Tomato infectious chlorosis virus*, (ToCV) *Tomato chlorosis virus* (Hirota *et al*., 2010). Cabe mencionar que una de las enfermedades virales más devastadoras en las regiones tropicales y subtropicales de tomate es el (TYLCV) *Tomato yellow curl virus*, ya que puede llegar a ocasionar perdidas hasta un 100% (Moriones y Castillo, 2000; Prasad *et al*., 2020).

2.2.5.3. Enfermedades causadas por nematodos

Existen enfermedades causadas por nematodos que limitan la producción. En estudios recientes se han reportado a *Pratylenchus brachyurus*, *P. delattrei, Rotylenchulus* y *Meloidogyne* spp., como parásitos de la raíz (Flis *et al*., 2018; Kidane *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2019). Los nematodos fitoparásitos como *Tylenchorhynchus* sp. y *Helicotylenchus* sp., han concebido pérdidas hasta de un 20% en el cultivo de tomate en la zona occidental de Nicaragua (Sasser y Freckman, 1987; Sasser, 1989; Overman, 1999; Shurtleff y Averre, 2000).

2.2.5.4. Enfermedades causadas por hongos y oomycetes

El cultivo de tomate se ve afectado por enfermedades inducidas por hongos y oomycetes, las más comunes en campo son antracnosis (*Colletotrichum coccodes)* tizón temprano (*Alternaria alternata*), tizon tardío (*Phytophthora infestans*), pudrición seca (*Fusarium oxysporum*), moho (*Neoscytalidium dimidiatum*), mancha gris *(Stemphylium solani*), moho gris (*Botrytis cinerea*), moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*), marchitez por *Pythium* spp., damping off (*Rhizoctonia solani)* y tizón sureño (*Sclerotium rolfsii)* (Cardona *et al*., 2016; Prasad *et al*., 2017; De Souza *et al*., 2018; Debbi *et al*., 2018; Gherbawy *et al*., 2018; Pérez *et al*., 2019; Sautua *et al*., 2019; Turkolmez *et al*., 2019; Wang *et al*., 2019).

2.3. Chile (*Capsicum annuum* L.)

2.3.1. Origen y distribución

El cultivo de chile se originó en las zonas tropicales de Latinoamérica. México es considerado un hogar para los chiles nativos (Hussain y Abid, 2011). Esta hortaliza está ubicada en el cuarto lugar en el mundo. Durante el proceso de evolución fue el primer cultivo domesticado en América. Las especies *Capsicum annuum*, *C. frutescens* y *C. chinense*, evolucionaron con base en un ancestro en común que creció en el norte del Amazonas, al noroeste de Brasil y Colombia (Saxena *et al*., 2016). El chile, es originario de Latinoamérica y es una hortaliza que se cultivá en varias regiones del mundo como: México, Turquía, Indonesia, España, Egipto, Nigeria, Argelia y Estados Unidos de América, pero China es el productor maximo (FAOSTAT, 2019).

2.3.2. Características morfológicas

El chile es un arbusto que mide de 0.5 a 1.5 metros de altura, su planta es erecta, ramificada y se cultiva una vez al año, tiene una raíz principal y múltiples raíces laterales; los tallos miden hasta 1 cm de diámetro con una coloración verde-marrón con manchas violáceas muy cerca de los nudos, sus hojas pueden ser alternas o simples, sus peciolos y pedicelos pueden medir hasta 10 cm de largo y 3 cm, en forma respectiva, los frutos puede llegar a medir hasta 8 cm de largo pero su tamaño es muy variable (CABI, 2020).

2.3.3. La taxonomía de chile basado en (GBIF, 2021).

Reino: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

Especie: *Capsicum annuum* L.

2.3.4. Producción mundial y nacional

Esta hortaliza juega un rol muy importante en las industrias farmacéuticas y en el sector comercial, con múltiples beneficios nutricionales, medicinales y económicos (Hussain y Abid, 2011). En el 2019, los mayores productores de chile fueron China, México, Turquía, Indonesia y España con 19.00, 3.23, 2.62, 2.58, 1.40, millones de toneladas (FAOSTAT, 2019).

En México, la producción de chile se distribuye en 32 estados, de los cuales el 95% de la producción se concentra en Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Veracruz y Zacatecas (SIAP, 2020).

2.3.5. Enfermedades

El chile es una de los cultivos de importancia que se produce a nivel mundial, pero existen algunos factores que limitan su producción, lo que afecta su rendimiento y calidad, donde sobresalen las enfermedades causadas por patógenos como hongos, Oomycetos, bacterias, nematodos y virus atacando la salud de las plantas (Sholberg *et al*., 2007; Castro *et al*., 2012; Saxena *et al*., 2016; Hafizah *et al*., 2017).

2.3.5.1. Enfermedades causadas por bacterias

Las enfermedades causadas por bacterias, inducen importantes daños en el cultivo de chile, las más comunes en campo son cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* ssp*. capsici*), necrosis foliar (*Xanthomonas euvesicatoria*) y marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) (Hwang *et al*., 2017; Mayanglambam *et al*., 2020; Nechwatal y Theil, 2020).

2.3.5.2. Enfermedades causadas por virus

Las enfermedades causadas por virus que se ha reportado afectaciones importantes en el cultivo de chile son: (TMV) *Tobacco mosaic virus*, (ToMV) *Tomato mosaic virus*, (TMGMV) *Tobacco mild green mosaic virus* y (PMMoV*) Pepper mild mottle virus* (Salem *et al*., 2019).

2.3.5.3. Enfermedades causadas por nematodos

Los principales nematodos que se encuentran asociados al cultivo de chile son: nematodo agallador (*Meloidogyne enterolobii*), nematodo falso agallador (*Nacobbus aberrans*), nematodo lesionador (*Pratylenchus*) y nematodo espiral (*Helicotylenchus multicinctum*) (Lax *et al*., 2015; Villar *et al*., 2016; Qing *et al*., 2018; Paiko *et al*., 2019).

2.3.5.4. Enfermedades causadas por hongos y Oomycetes

Existen enfermedades en diversas áreas productoras de chile, causadas por hongos y oomycetes donde las plantas muestran una amplia gama de síntomas. Las más importantes a nivel mundial son: antracnosis (*Colletotrichum* spp.), mancha foliar (*Cercospora capsici*), marchitez (*Phytophthora capsici*), tizón (*P. nicotiana*), pudrición de raíz (*Fusarium solani*), marchitez (*F. oxysporum*), marchitez (*Verticillium* spp.), damping off (*Rhizoctonia solani*), pudrición de la raíz (*Pythium aphanidermatum*) y pudrición carbonosa de corona y raíz (*Macrophomina phaseolina*) (Kelley *et al*., 2009; Aliyu *et al*., 2012; Hussain *et al*., 2013, Mmbaga y Gurung 2018; De silva, 2019).

2.4. Paño de la papa causados por *Colletotrichum coccodes* (Wallr) S. Hughes.

2.4.1. Importancia y distribución

La enfermedad descrita como antracnosis o pudrición negra en solanáceas; regionalmente se le conoce como paño de la papa, es causada por el hongo *C. coccodes,* y afecta a cultivos como la papa, tomate, chile entre otros, ya que causa daños en tallos, raíces, estolones, hojas, tubérculos, fruto verde y maduro (Costa y Pozza, 2006; Jamiotkowska *et al*., 2018; SENASICA, 2019).

El hongo afecta diversos órganos de las plantas, su distribución se ha reportado en diferentes cultivos como papa, tomate, chile, chícharo, vid, cebolla, soya y menta, cabe resaltar que el impacto del hongo es variable dependiendo la zona de cada país (Mohan *et al*., 1992; Uribe y Loria, 1994; Johnson *et al*., 2002; Riccioni *et al*., 1998; Gilardi *et al*., 2013; Mikulic *et al*., 2013; Heno *et al*., 2016; Vrisman *et al*., 2016; Belov *et al*., 2017; Rojo *et al*., 2017; Tyvaer *et al*., 2019; Belle *et al*., 2020).

2.4.2. Agente causal del paño de la papa

Colletotrichum coccodes infecta la superficie de los tubérculo-semilla (Uribe y Loria, 1994). Es un hongo productor de esclerocios los cuales se aglomeran en la epidermis de los tubérculos, lo cual resulta en el oscurecimiento de las áreas afectadas, de donde se origina el paño de la papa, como nombre común de la enfermedad en el noroeste de México. El patógeno también afecta a las raíces y hojas que se encuentran en contacto con el suelo (Tsror *et al*., 1999). En estudios recientes se ha reportado la presencia de este hongo en cultivos de papa y frutos de tomate en México (Nieto *et al*., 2019; Pérez *et al*., 2019).

2.4.3. Clasificación taxonómica basado en (GBIF, 2021).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum coccodes*

2.4.4. Síntomas del paño de la papa

El rol que juegan las condiciones ambientales tiene gran impacto sobre la gravedad y expansión de cualquier enfermedad (Saxena *et al*., 2016). Los tuberculos, estolones, raíces y tallos basales de la papa son susceptibles a *C. coccodes* (Figura 1) (Andrivon *et al*., 1998). El triángulo de la enfermedad conduce al establecimiento de patógenos en plantas sanas (Agrios, 2005).

La pudrición por el fitopatógeno inicia con pequeñas manchas de color café claro que pueden expandirse con rapidez, donde se observa la formación de círculos irregulares con hundimiento en la parte central; a su vez, el patógeno causa deshidratación y muerte de las hojas (Agrios, 2005). Los síntomas se presentan en los frutos cuando las condiciones ambientales son favorables, se pueden observar lesiones angulares y hundidas; se tornan en manchas negras, con múltiples masas en acérvulos con setas oscuras (Figura 1) (Saxena *et al*., 2016).

.

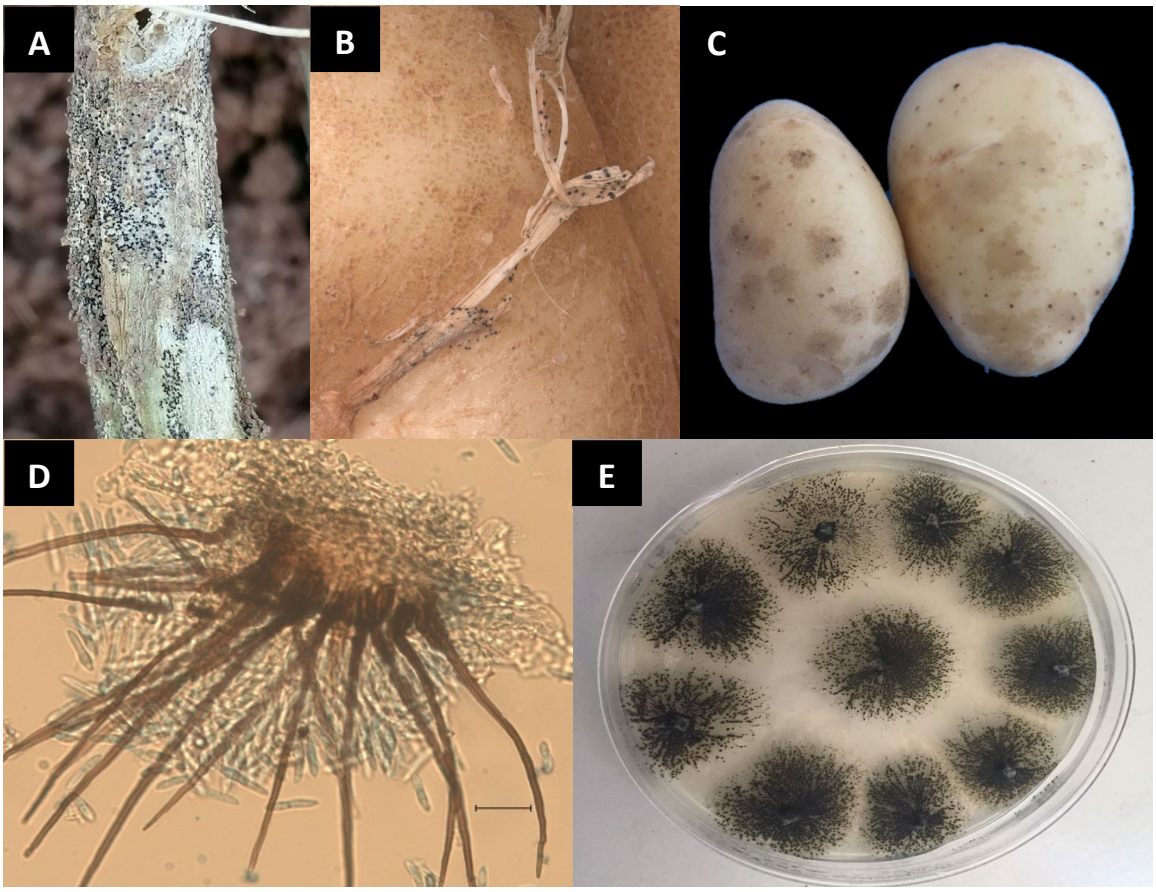

Figura 1. Síntomas causados por *Colletotrichum coccodes* en papa A) tallo de la variedad Fianna con presencia de acérvulos, B) tubérculos con presencia de acérvulos en el estolón, C) tubérculo con síntomas del paño de la papa, D) acérvulos con setas y conidios en masa E) crecimiento colonial de *C. coccodes* en medio de cultivo PDA.

2.4.5. Ciclo de vida

El ciclo de vida de las especies de *Colletotrichum* está compuesto por dos fases. Por ejemplo, la variabilidad genética se genera en la fase sexual, mientras que la fase asexual es la encargada de la diseminación del hongo. Las temperaturas óptimas para el crecimiento micelial de las especies del género *Colletotrichum* varía de 26 ºC a 32 ºC. Las especies de este hongo son muy sensibles a la humedad relativa favoreciéndoles con una variación de 99% a 100% (ki kim *et al*., 1998; Abang *et al*., 2003). El ciclo de la enfermedad comienza con los conidios que son estructuras de infección y reproducción del hongo, estas se producen de manera abundante en unas estructuras llamadas acérvulos que se forman en la superficie de las plantas infectadas, estos conidios son dispersados por salpicadura de lluvia o rocío y depositados en las hojas, ramas y suelo. Una vez que los conidios se encuentran en las hojas, estos germinan formando apresorios que sirven como estructuras de adherencia en la planta y le permite sobrevivir sin causar síntomas en la hoja comportándose como biotrófico, es decir, que necesita el tejido vivo para sobrevivir. La infección continúa durante la temporada de crecimiento, especialmente cuando las plantas están estresadas, durante largos períodos cálidos y secos. A su vez, la colonización de tubérculos puede ocurrir en todas las etapas de desarrollo, pero la formación de esclerocios en la superficie del tubérculo es más frecuente al final de la temporada durante la primavera, cuando las temperaturas del suelo están en su punto más óptimo, para el desarrollo de la enfermedad. Los esclerocios permanecen en tubérculos infectados y en restos de plantas y suelo durante el verano. Los conidios se propagan en múltiples ciclos durante la temporada agrícola (Figura 2).

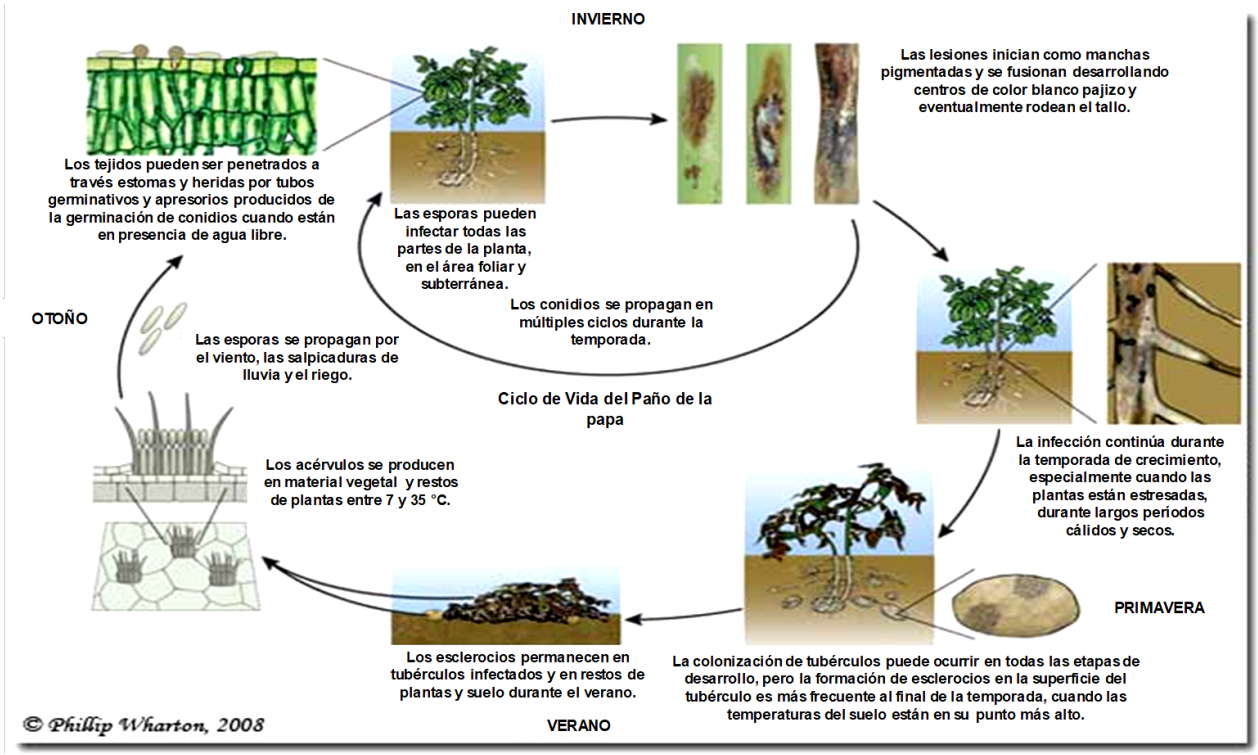

Figura 2. Ciclo de vida de *Colletotrichum coccodes*. Phillip Wharton y William Kirk, 2008.

2.4.6. Proceso de infección del paño de la papa

Colletotrichum spp., desarrolla dos estrategias en su proceso de infección, el conidio se adhiere y germina sobre la superficie de la planta, donde produce un tubo germinativo para la formación del apresorio el cual penetra la cutícula. En la colonización hemibiótrofica intracelular, al momento de penetrar las células epidérmicas, el tamaño de las hifas se incrementa, y forma vesículas de infección y una hifa grande primaria que se invagina en la membrana plasmática, a su vez la hifa principal coloniza células de la epidermis y forman hifas secundarias necrotróficas delgadas. Las cuales se extienden y degradanlas paredes celulares a través de enzimas. En la infección intramural subcuticular, cuando ocurre la penetración, las hifas inter e intracelulares se introducen en las células epidérmicas la cual ocaciona una afectación en la planta (Perfect *et al*., 1999; Cannon *et al*., 2012).

2.4.7. Efecto de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de la enfermedad

Para el desarrollo de la enfermedad causada por *Colletotrichum* spp., se requieren temperaturas que varíen de 15 y 30 °C (Strand, 2008). Cuando los periodos de follaje mojado coinciden con dichas temperaturas, la enfermedad incrementa su severidad en las diversas especies hospedantes. La temperatura óptima para el desarrollo del fitopatógeno es a 25 °C y suelos húmedos (Firman y Allen, 1993; Hide *et al*., 1994). Algunos estudios han demostrado que el paño de la papa también se manifiesta en condiciones de humedad relativa que varía de 99% a 100% (ki kim *et al*., 1998; Abang *et al*., 2003).

2.4.8. Uso de cultivares tolerantes

La tolerancia en el hospedante contra el hongo es un elemento deseable en el manejo sustentable de la enfermedad, pues ayuda a disminuir las perdidas y baja los costos de los agroquímicos (Agrios, 2005). Existen también estudios sobre variedades con características resistentes a *Colletotrichum* sp., las cuales pueden ser investigadas para conocer la herencia de la resistencia de una generación a otra (Kim *et al*., 2008). Se ha reportado el uso de cultivares que muestran diferentes respuestas al paño de la papa como Lady Felicia, Cheyenne y Lady Christl que mostraron una baja resistencia, por otra parte, el cultivar Erika y Gwenne, exhibieron alta resistencia (Massana *et al*., 2020).

2.4.9. Control cultural

El hongo se transmite por diferentes vías, a través del viento, agua, suelo y tubérculos semilla contaminados, se recomienda el uso de semilla certificada y suelo con buen drenaje para evitar excesos de humedad. La rotación de cultivos, así como la eliminación de plantas hospederas y las plantas enfermas se recomienda como medidas de control (Than *et al*., 2008). La técnica de solarización y el arado de vertedera resultaron ser efectivos para controlar al hongo.

En lo que respecta a la solarización mostró una reducción del 45% de la incidencia de la enfermedad, en los sitios donde el suelo se cubrió con plástico trasparente por ocho semanas y las temperaturas alcanzaron hasta 56 °C en la superficie; por otro lado, el arado de vertedera a una profundidad de 30 cm mostró una reducción del 34% de la incidencia del patógeno *C. coccodes*; mientras, que el uso del arado de vertedera muestra reducción en la incidencia a los 60 cm de la enfermedad del 17% (Denner *et al*., 2000).

2.4.10. Control biológico de la enfermedad

El control biológico surge como una buena herramienta para controlar enfermedades en etapas de desarrollo del cultivo y postcosecha (Hernández *et al*., 2007). Este método se ha estudiado mediante la utilización de productos botánicos con base en extractos provenientes de plantas medicinales, con resultados eficientes por las propiedades antimicrobianas, estas se caracterizan por no generar residualidad y debido a que sus propiedades no son tóxicas (Ngullie *et al*., 2010; Johnny *et al*., 2011).

2.4.11. Control químico

Debido a la falta de un método efectivo para el control de la enfermedad, se han buscado opciones a través de productos químicos para disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad (Saxena *et al*., 2016) en este sentido, se ha recurrido a fungicidas sistémicos y traslaminares para proteger cultivos de papa y tomate en etapas fenológicas de senescencia (Belov *et al*., 2017). Para el control químico de la enfermedad se utilizan fungicidas con base en cobre, así como benzimidazoles, triazoles y ditiocarbamatos (Waller, 1992).

2.4.12. Control postcosecha

El paño de papa puede desarrollarse en etapa de almacenamiento, por lo que el manejo de la enfermedad durante este proceso se concentra en el secado de los tubérculos, con la utilización de ventiladores a través del flujo de aire. La temperatura es un elemento de suma importancia al momento de almacenar los frutos y tubérculos. En algunos países los tubérculos de papa se almacenan por periodos prolongados a 2.5 °C (Peters *et al*., 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

En ciclos agrícolas recientes se ha observado en Sinaloa, un incremento en la incidencia del paño de la papa. En esta región la superficie de siembra de esta Solanácea fue 13,250 ha de papa, de las cuales el 50% se utiliza para el consumo en fresco donde la calidad del tubérculo se ve mermada por dicha enfermedad. A la fecha no se ha confirmado que existen estudios sobre el rango de hospedante del hongo lo cual es fundamental en la implementación de rotación de cultivos como estrategia para el manejo de la enfermedad. Así mismo, no existen estudios que indiquen la efectividad biológica *in vitro* de fungicidas con potencial para el control de la enfermedad en campo. Por lo anterior, se justifica la determinación de la susceptibilidad de tomate y chile a aislados de *C. coccodes* obtenidos de papa. En vista de que los productores recurren al uso de fungicidas para el control de la enfermedad, también se justifica el desarrollo de estudios de efectividad biológica *in vitro* y de esta forma seleccionar aquellos productos que muestren una mejor efectividad biológica contra el fitopatógeno, mismos que se utilizaran en estudios en invernadero y campo en el corto plazo.

IV. HIPÓTESIS

Colletotrichum coccodes es el agente causal del paño de la papa en el norte de Sinaloa.

Colletotrichum coccodes obtenido de papa (*Solanum tuberosum* L.), infectan al mismo cultivo, así como al tomate y al chile serrano.

La aplicación de *Bacillus cereus* y los grupos benzimidazol, conazol clorado, triazol, estrobilurina y cobre, inhiben el crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum coccodes*.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar al fitopatógeno asociado al paño de la papa y determinar su patogenicidad en este cultivo, así como en tomate y chile, así como determinar la efectividad biológica *in vitro* de *Bacillus cereus* y los fungicidas procloraz, propiconazol, fluoxastrobin, metil-tiofanato, hidróxido cúprico contra *Colletotrichum coccodes* agente causal del paño de la papa.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológica y molecularmente aislados de *C. coccodes* asociados al paño de la papa.
- Determinar si los aislados del hongo que ocurren en papa son patogénicos en tomate y chile en condiciones de invernadero.
- Determinar la efectividad biológica *in vitro* de *Bacillus cereus* y la de los fungicidas procloraz, propiconazol, fluoxastrobin, metil-tiofanato, hidróxido cúprico contra el hongo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Purificación y conservación de aislados fúngicos

Se utilizaron los aislados 1C, 1.1C y 3C de *C. coccodes.* El 1.1C se había caracterizado morfológica y molecularmente por el Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, quien lo proporcionó para utilizarse en el presente estudio. Los otros dos fueron proporcionados por el Dr. Rubén Félix Gastélum los cuales no estaban identificados. Los tres aislados se obtuvieron de tubérculos con síntomas paño de la papa, en el estado de Sinaloa.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología y Microbiología de la Unidad Regional Los Mochis de la Universidad Autónoma de Occidente. Los aislados se purificaron a partir de puntas de hifas, las cuales crecieron en medio de cultivo en papa dextrosa agar (PDA) (BD Bioxon LAVYTECK; Guadalajara, Jalisco, México), las cuales se transfirieron al mismo medio de cultivo mediante un bisturí flameado y enfriado. Enseguida se tomaron pequeñas porciones de micelio y se transfirieron a tubos inclinados con PDA y una vez que el micelio cubrió todo el medio, se agregaron 3 mL de aceite mineral estéril y los tubos se conservaron a 15 °C, para utilizarse en estudios subsiguientes.

6.2. Caracterización morfológica de aislados fúngicos

Se examinaron los caracteres macroscópicos y microscópicos de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *C. coccodes*. Estos aislados se cultivaron en medio PDA a partir de discos miceliales que se encontraban almacenados en aceite mineral a 15 ºC. Para determinar la tasa de crecimiento micelial de cada uno de los aislados, se utilizaron discos miceliales (5 mm de diámetro) del margen de las colonias de 10 días de edad, los cuales se transfirieron a PDA. Los cultivos se incubaron a 25 ºC bajo oscuridad continúa. El diámetro del crecimiento micelial de cada colonia se registró cada 48 h durante 10 días, para determinar la tasa de crecimiento micelial por día, de acuerdo a los procedimientos de (Benítez *et al*., 2007), se incluyeron seis repeticiones (seis placas Petri) de cada uno de los cultivos, y se distribuyeron en un arreglo completo al azar.

Donde:

Cf: Crecimiento diámetro final expresado en mm

Ci: Crecimiento diametral inicial (día uno) expresado en mm

Tf: Tiempo final en el que termina el crecimiento fúngico (día final)

Ti: Tiempo inicial (día uno)

Para los estudios morfométricos de conidios, se transfirieron los aislados 1C, 1.1C y 3C a PDA y se incubaron a 25 °C, durante 10 días en obscuridad continua. En 30 conidios de cada aislado se registró el color, forma, largo y ancho, bajo un microscopio Axio Imager M2.

6.3. Caracterización molecular

La caracterización molecular de los aislados fúngicos obtenidos de tubérculos de papa, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular en la Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis.

6.3.1. Extracción de ADN genómico de los aislados

La identificación molecular de los aislados, se realizó mediante el uso de micelio aéreo de cada una de las cepas, de ocho días de cultivo, al raspar en forma directa del medio con una espátula estéril y se colocaron en microtubos viales de 2 mL.

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el método CTAB por medio de las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 50 mg de micelio introduciéndolo en viales de 1.6 mL con 500 µL de solución buffer CTAB (Tris 100 mM pH 8, 20 mM de EDTA pH 8, NaCl 1.4 M, 2% CTAB, 2-mercaptoethanol al 0.2%), se homogenizó la mezcla durante 10 s en vórtex y se incubó durante 30 min a 65 ºC. Pasado el tiempo se agregaron 250 µL de cloroformo, se pasó de nuevo por el vórtex durante 10 s y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un vial estéril y se agregó 500 µL de isopropanol, agitándose hasta observar la formación del ADN. Los tubos se incubaron un mínimo de 10 min a -20 °C. Para sedimentar el ADN, los viales se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante se descartó y para limpiar el pellet se agregaron 500 µL de etanol al 70%, centrifugándolo a 13,000 rpm durante 5 min, pasado el tiempo se decantó el sobrenadante, los tubos se colocaron sobre papel absorbente a temperatura ambiente para favorecer la evaporación de etanol, al final se resuspendió el ADN en 50 µL de agua libre de nucleasas.

6.3.2. Electroforesis

Para observar la calidad de la extracción de ADN se mezclaron 2 µL de DNA y 8 µL de colorante naranja G (0.025% de naranja G, 25 mM de EDTA pH 8 y 30% de glicerol). Se realizó una corrida de electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.2 µL/mL. El proceso se corrió a 80 V durante 40 min en una cámara de electroforesis con el buffer TAE 1X. Finalmente, el DNA se visualizó en un documentador de imágenes (GelDoc, Biorad).

6.3.3. Amplificación de ADN

Para la identificación de los aislados fúngicos, se amplificó la región del ADNr (recombinante) nuclear mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), se utilizó a los oligonucleótidos transcritos internos (ITS); ITS4/ITS5, para amplificar un fragmento de 600-700 pb; ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) e ITS5 (5´-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3´) (White *et al*. 1990). Secuencias de regiones de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se amplificaron utilizando los pares de oligonucleótidos GDF / GDR, (5´-GGTACCGGATCCGAATTCAAGCTTATGGCTCCCATCAAGGTC (Templeton *et al*., 1992) y ACT – 512F / ACT – 783R, (TACGAGTCCTTCTGGCCCAT), la cual amplifica de 200-300 pb (Carbone y Kohn 1999). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador automático (C1000™, BIO-RAD), de acuerdo con el protocolo de Pérez *et al*. (2019). La reacción para la PCR se realizó en viales de 200 µL en un volumen total de 25 µL que contiene: 1 µL del templado de ADN, 2.5 µL Buffer de PCR al 10X, 1 µL $MgCl_2$ al 50 mM, 0.6 µL cebadores sentido y antisentido al 10 mM, 0.7 µL dNTP's al 10 mM, y 0.01 U/µL de Taq polimerasa (*Invitro*genCat. 18038-018).

Las condiciones de termociclage fueron las siguientes: para la región ITS consistió de un ciclo a 94 °C por 2 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 30 s a 55 °C, 60 s a 72 °C, y 10 min a 72 °C; para los genes GAPDH y ACT; las condiciones fueron 94 °C por 2 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 30 s a 57 °C, 1 min a 72 °C y 10 min a 72 °C. Cada experimento incluyó una reacción sin ADN (control negativo) con la finalidad de monitorear la contaminación potencial por ADN exógeno. Los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% p/v en TBE 0.5x (0.045 M Trizma base, 0.045 M ácido bórico, 0.001 M EDTA, pH 8.0) y se visualizaron en un transiluminador con fluorescencia UV; después de la tinción con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se documentaron mediante un procesador de imágenes (GelDoc, Biorad). Los productos de PCR amplificados fueron secuenciados.

6.3.4. Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR, se realizó en el aislado 1C, 1.1C y 3C extraido de síntomas de paño de la papa, los cuales se enviaron a Macrogen Humanizing Genomics (Macrogen Inc., Seúl, Corea del sur), con la finalidad de minimizar los errores de secuenciación, se obtuvieron tanto las cadenas 5´➠ 3´como las 3´➠5´.

6.3.5. Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a comparación con secuencias reportadas en el Banco de Genes (Gen Bank), del Centro Internacional para la Información en Biotecnología (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) con el programa BLAST-N. Para conocer la relación filogenética existente entre cada una de las secuencias se realizó un dendograma, donde se incluyeron las secuencias de cada una de las cepas aisladas en este trabajo y secuencias de referencia reportadas en la base de datos GenBank para la construcción del análisis filogenético. La inclusión de secuencias de referencia en el análisis filogenético permitió corroborar la identidad de estás y organizarlas en sus grupos correspondientes. El análisis filogenético se realizó con el método Clustal w de la serie de programas MegAlingn.

6.4. Experimento de invernadero

6.4.1. Tratamiento del suelo con calor húmedo

El trabajo de investigación se desarrolló durante los meses de noviembre a febrero del 2021. El suelo se pasteurizó en un tonel de 200 L. (Figura 3A). En el tonel se colocaron costales de 50 kg, que consistían de dos terceras partes de suelo franco-arcilloso y una tercera parte de arena (arena 48.20, limo 12.72 y arcilla 39.08). Previo a la pasteurización el suelo se humedeció y los costales con el suelo se sometieron a vapor de agua durante cinco horas en el tonel arriba mencionado, el suelo pasteurizado se reposó durante 48 h antes de colocarse en macetas en el invernadero (Figura 3B).

Figura 3. A) Tonel para generar calor húmedo, B) macetas de 25 cm de diámetro, con suelo agrícola, tratado con calor húmedo.

6.5. Pruebas de patogenicidad

6.5.1. Preparación de inoculó

A las colonias de los tres aislados (1C, 1.1C y 3C) de *C. coccodes* de 10 días de edad se les agregaron 5 mL de agua destilada estéril para desprender el micelio y conidios, mediante una espátula esterilizada. Enseguida las suspensiones se filtraron a través de una malla quesera y se ajustaron en una cámara de neubauer a una concentración de 1 x 10^5 conidios mL^{-1}. Para estimar el número total de esporas por mL se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Numero de esporas} = \frac{(\Sigma \text{ de esporas contadas})\ (10{,}000)}{\text{mL}}$$

Para el ajuste de las suspensiones a una concentración de 1 x 10^5 conidios mL^{-1} se utilizó la ecuación:

$$C1V1=C2V2$$

6.5.2. Inoculación de tubérculos semilla brotado y plántulas de tomate y chile con el método de aspersión

Tubérculos brotados de papa var. Fianna se lavaron con agua corriente, se secaron sobre papel absorbente y se asperjaron con etanol al 70%, enseguida se sumergieron en NaClO durante cuatro minutos, para finalizar se lavaron con agua destilada, se secaron de nuevo en papel absorbente y se asperjaron con una suspensión de conidios de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *C. coccodes* en forma separada. Enseguida, se sembraron en macetas de plástico de 25 cm de diámetro, con suelo pasteurizado como se indica en el apartado 6.4.1.

Plántulas de tomate híbrido DRD 8551 (Seminis; Culiacán, Sinaloa, México) y chile híbrido Plata (CapGen SEEDS; Culiacán, Sinaloa, México), de 30 y 40 días de edad respectivos, se inocularon mediante la aspersión con una suspensión de conidios (1 x 10^5 con/mL^{-1}), hasta el punto de escurrimiento. Enseguida se trasplantaron en macetas de plástico de 13 cm de diámetro, con suelo pasteurizado. Las plantas de papa, tomate y chile se regaron conforme a sus requerimientos hídricos y se fertilizaron cada siete días con Miracle-gro® Water Soluble All Purpose Plant Food (15-30-15).

Los tubérculos de papa brotados testigo, así como las plántulas de tomate y chile se asperjaron con agua destilada estéril antes de trasplantarse en macetas con suelo pasteurizado, los tratamientos se distribuyeron en un arreglo completo al azar con 10 repeticiones (10 macetas con un tubérculo de papa cada uno y 10 macetas con una plántula de tomate o chile cada una). El experimento se repitió una vez. El primero de ellos se estableció 28 de octubre y el segundo el 11 de noviembre de 2020.

6.5.3. Evaluación de patogenicidad en plantas de papa, tomate y chile.

La patogenicidad de los aislados de *C. coccodes* en papa se determinó al momento de la cosecha, 105 días después de la inoculación (ddi), mientras que la patogenicidad de dichos aislados, se determinó en tomate y chile en la etapa de inicio de fructificación a los 150 ddi. La severidad de la enfermedad para los tallos de papa y las raíces de tomate y chile, se evaluaron después de que las plantas se secaran y murieran en el invernadero en las macetas. La densidad de acérvulos se evaluó de forma visual con una escala del 0 a 5, donde 0 = sin esclerocios, 1 = 1 a 10%, 2 = 11 a 30%, 3 = 31 a 50%, 4 = 51 a 75% y 5 = 76 a 100% de la superficie cubierta de acérvulos.

6.6. Efectividad biológica *in vitro* de fungicidas

La efectividad biológica *in vitro* de metil-tiofanato, hidróxido cúprico, propiconazol, fluoxastrobin y procloraz se determinó mediante ensayos de inhibición del crecimiento micelial de los aislados (1C, 1.1C y 3C) de *C. coccodes*. Para ello, se preparó una solución stock de los fungicidas en agua destilada estéril y se agregó al medio PDA después de la esterilización, para obtención de las siguientes concentraciones: 100, 150, 200, 300 y 500 µg mL $^{-1}$ para metil-tiofanato; 100, 300, 400, 500 y 1000 µg mL $^{-1}$ para hidróxido cúprico; 1, 2, 3, 5 y 10 µg mL $^{-1}$ para propiconazol; 1, 5, 10, 100 y 300 µg mL $^{-1}$ para fluoxastrobin y 0.1, 0.5, 1, 10 y 100 µg mL $^{-1}$ para procloraz. El tratamiento testigo consistió en la utilización de placas de Petri con el mismo medio de cultivo, pero sin fungicida. Para cada aislado se tomaron discos miceliales de 5 mm de diámetro del margen con crecimiento activo de una colonia de siete días de crecimiento y se transfirieron al centro de las placas Petri con medio PDA con los fungicidas a las diferentes concentraciones. Las placas se incubaron durante 10 días a 25 °C en oscuridad continua. El experimento se realizó en dos ocasiones en el laboratorio y los tratamientos se distribuyeron en un arreglo completo al azar con seis repeticiones (seis cajas de Petri). El diámetro de la colonia en cada placa Petri se midió en forma perpendicular en dos direcciones y se obtuvo el promedió de ambas mediciones. Para determinar la efectividad biológica de los tratamientos se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con la siguiente fórmula empleada por Vincent (1947): % de inhibición = (crecimiento radial de la colonia testigo sin fungicida crecimiento radial de la colonia con fungicida/crecimiento radial de la colonia testigo sin fungicida) x 100.

6.7. Determinación de efectividad biológica *in vitro* de *Bacillus cereus* contra aislados de *Colletotrichum coccodes*

Una cepa de *Bacillus cereus* (B25; formulación en polvo soluble) proporcionada por el Dr. Ignacio Maldonado Mendoza del CIIDIR-Sinaloa del IPN, se utilizó en el presente estudio, la cual se aisló de la rizósfera de plantas de maíz. La actividad antagónica *in vitro* se ensayó contra el aislado 1C de *C. coccodes*. En placas de Petri con PDA. Se colocó un bloque de agar (5mm de diámetro) en el medio del cultivo el cual contenía el micelio del aislado del hongo.

Enseguida se colocaron cuatro alícuotas 5 µL de la suspensión bacteriana, en la caja de Petri donde se encontraba el bloque con el hongo; las cuatro alícuotas de bacteria se colocaron en la periferia de la caja de Petri de manera equidistante a 2 cm de la siembra del hongo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 8 días. La formulación en polvo de la bacteria se comparó con la bacteria desarrollada por 48 h en Agar nutritivo (BD Bioxon LAVYTECK; Guadalajara, Jalisco, México), los bloques del hongo se utilizaron como control, los experimentos concluirán una vez que el control alcanzó los 4 cm de diámetro.

6.8. Análisis estadístico de datos

En el ensayo de patogenicidad en papa, las lesiones expresadas en cm^2, así como la severidad en tallos de papa y raíces de tomate y chile fueron sometidas a la prueba estadística de Kruskal Wallis (No paramétrica), los datos se analizaron con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, y una prueba de medias Conover $\alpha = 0.05$, cada tratamiento fue evaluado con seis réplicas para la patogenicidad en tubérculos y diez replicas para la severidad en tallos y raíces.

En los ensayos de peso freso de raíz y follaje en el cultivo de tomate y chile los datos fueron sometidos a una prueba estadística de Shapiro Wilk. Enseguida, los datos se analizaron por medio de la prueba ANOVA con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ y una prueba de medias de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$ cada tratamiento fue evaluado con cuatro réplicas.

Los datos de los estudios *in vitro* relativos a la inhibición del crecimiento micelial de los diferentes fungicidas se sometieron a pruebas de normalidad recurriendo a la prueba de Kolmogorov smirnov. Enseguida, los datos se analizaron por medio de la prueba Kruskal Wallis (No paramétrico) con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ y una prueba de Conover $\alpha = 0{,}05$, cada tratamiento fue evaluado con seis réplicas.

Para los ensayos *in vitro* de antagonismo relativos a la inhibición del crecimiento micelial de la bacteria se sometió a la prueba de normalidad, recurriendo a la prueba estadística de Shapiro Wilk. Enseguida, los datos se analizaron por medio de la prueba Kruskal Wallis (No paramétrico) con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ y una prueba de Conover $\alpha = 0{,}05$ cada tratamiento fue evaluado con tres réplicas.

Todos los tratamientos fueron evaluados con el software estadístico InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

VII. RESULTADOS

7.1. Características fenotípicas de aislados de *Colletotrichum* y morfometría de los conidios

Después de 10 días de incubación en oscuridad continua, en PDA, las colonias de tres aislados de *Colletotrichum* no mostraron crecimiento aéreo y crecieron adheridas al medio de cultivo con márgenes irregulares y filiformes, los aislados 1C y 1.1C mostraron color oscuro sin pigmentación y anillos concéntricos. El aislado 3C mostró oscurecimiento en el centro de la colonia y el resto de la misma fue de color grisáceo (Figura 4). La tasa de crecimiento micelial de los tres aislados arriba mencionados vario de 8.12 a 8.33 mm día^{-1} (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características culturales y morfológicas de tres aislados de *Colletotrichum* obtenidos de tubérculos con síntomas de paño de la papa en lotes comerciales de Sinaloa.

Aislado	Colonia	
	Color	TC[a] (mm día^{-1})
	PDA [b]	PDA
1-C *C. Coccodes*	Negro	8.12
1.1-C *C. Coccodes*	Negro	8.22
3-C *C. Coccodes*	Gris	8.33

[a] = Tasa de crecimiento micelial (incubación a 25 °C en oscuridad continua).

[b] = Medio de cultivo papa dextrosa agar (incubación a 25 °C en oscuridad continua).

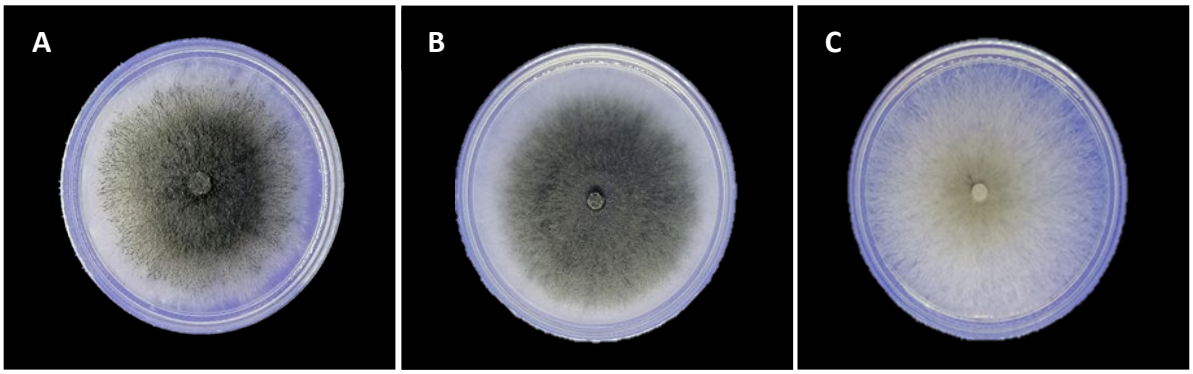

Figura 4. Colonias de aislados A) 1C, B) 1.1C y C) 3C de *Colletotrichum* obtenidas de tubérculos con síntomas de paño de la papa, desarrolladas en PDA después de 10 días de incubación en oscuridad continua a 25 °C.

Los rangos de longitud de los conidios del aislado 1C fueron de 8.5 ×18.6 µm, con un promedio de 13.6 µm; para el ancho fueron de 3.8 a 8.0 µm, con un promedio de 5.9 µm. En el aislado 1.1C los rangos de longitud variaron de 9.3 a 16.8 µm, con un promedio de 13.8 y el ancho fue de 3.5 a 8.3 µm, con un promedio de 5.9 µm. Para el aislado 3C los rangos de longitud variaron de 11.2 a 16.3 µm, con un promedio de 13.8 µm, y el ancho fue de 2.9 a 5.3 µm, con un promedio de 4.1 µm (Cuadro 2).

Los tres aislados presentaron conidios hialinos, con un extremo cilíndrico, elipsoidal y con un extremo más estrecho que el centro (Figura 5). Con respecto al intervalo de medidas promedio de los conidios de los aislados fue de 8.57-18.65 × 2.99-8.35 µm.

Figura 5. Conidios de aislados A) 1C, B) 1.1C y C) 3C de *Colletotrichum* formados en medio de cultivo PDA después de 10 días de incubación a 25 ºC en oscuridad continua.

Cuadro 2. Características morfométricas de conidios de tres aislados de *Colletotrichum* obtenidos a partir de tubérculos con síntomas del paño de la papa desarrolladas en un medio de cultivo PDA.

Medio	Especie	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Forma
	1C	8.5 - 18.6[x]	3.8 - 8.1	Cilíndrica
	C. coccodes	13.6[y]	5.9	Fusiforme
		2.4[z]	1.1	Elipsoidal
	1.1 C	9.3 - 16.8	3.5 - 8.3	Cilíndrica
PDA	*C. coccodes*	13.8	5.9	Fusiforme
		1.7	1.0	Elipsoidal
	3 C	11.2 - 16.3	2.9 - 5.3	Cilíndrica
	C. coccodes	13.8	4.1	Fusiforme
		1.3	0.7	Elipsoidal

Los valores de las dimensiones de cada uno de los tres aislados (µm) representan el promedio de 30 mediciones de conidios obtenidos de tubérculos con síntomas del paño de la papa.

[x] El primer renglón muestra los rangos mínimos y máximos de la longitud de los conidios; [y] El segundo renglón muestra la media de 30 mediciones de conidios por aislado; [z] El tercer renglón indica la desviación estándar.

7.2 Identificación molecular

La concentración de ADN genómico de los tres aislados de *Colletotrichum* varió de 344.9 a 1285.7 ng μL^{-1}, y la absorbancia fue de 2.15 a 2.94. Los aislados se identificaron a nivel especie, mediante la amplificación de tres segmentos de genes (ITS4/ITS5, GDF/GDR y ACT512F/ACT783R). La amplificación de productos por PCR fue de 500-600 pares de bases (pb), para el espaciador transcrito interno (ITS4/ITS5) (Figura 6), el cual indicó que los aislados 1C, 1.1C y 3C pueden ser de la especie de *C. coccodes*. Esto debido a que se presentó la amplificación de los productos de PCR con los iniciadores ITS4/ITS5.

7.2.1. Amplificación por PCR de regiones conservadas de eucariontes

Los productos de amplificación obtenidos de las regiones ITS se muestra en la figura 6.

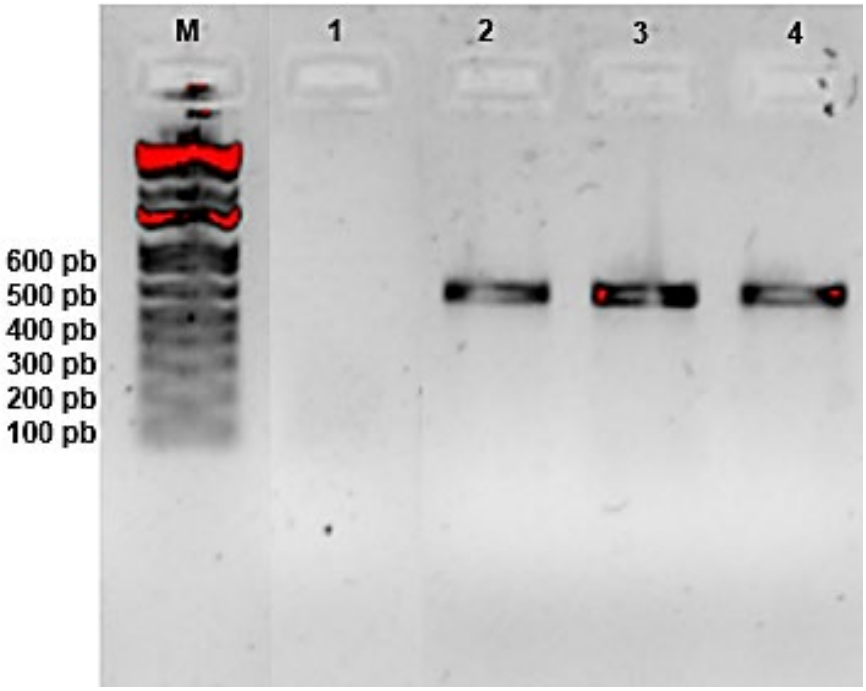

Figura 6. Productos amplificados por PCR de tres muestras de *Colletotrichum* provenientes de tubérculos con síntomas de paño de la papa amplificados con oligonucleótidos de ITS4/ITS5. Gel de agarosa al 1%, donde M, corresponde al marcador molecular 1kb, carril 1: control negativo, carril 2: aislado 1C, carril 3: aislado 1.1C y carril 4: aislado 3C.

Los productos amplificaron 300 pb para el gliceraldheido-3-fosfato deshidrogenasa (GDF/GDR) (Figura 7), la cual indicó que los aislados 1C, 1.1C y 3C pueden pertenecer a la especie de *C. coccodes*. Esto debido a que se presentó la amplificación de los iniciadores (GDF/GDR) y ACT. Pero no hubo amplificación al usar el iniciador ACT para el aislado 1 como lo muestra la (Figura 7). El producto amplificado con el fragmento del gen actina ACT512F/ACT783R fue de 300 pb excepto para el aislado 1C, el cual no se logró amplificar. Los testigos negativos no amplificaron ninguna banda.

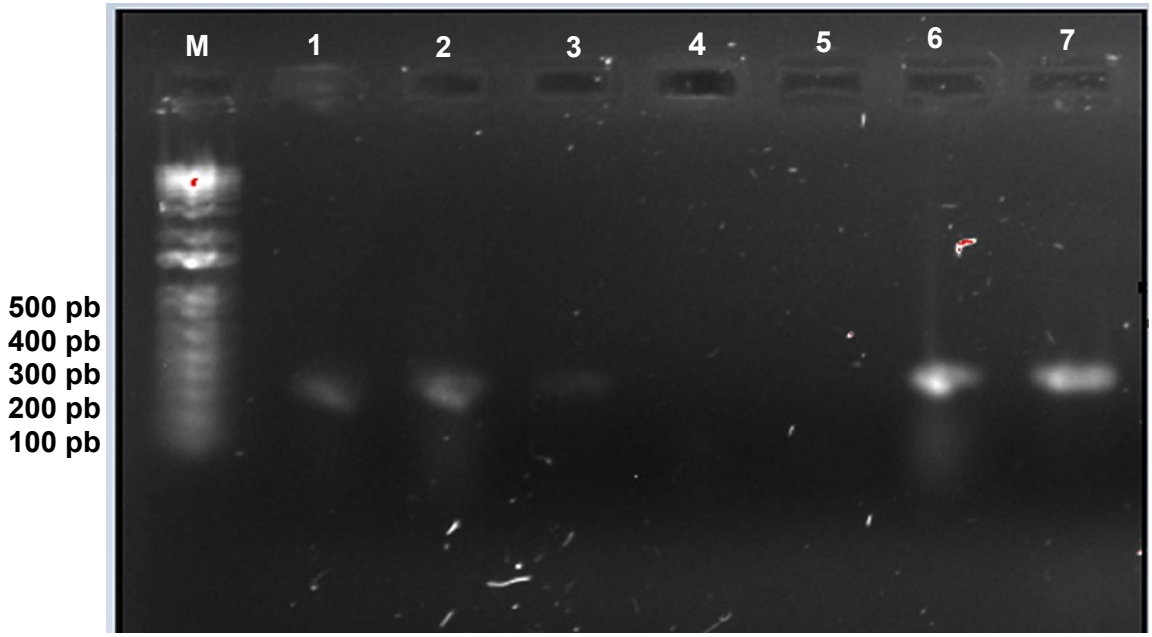

Figura 7. Productos amplificados por PCR de tres muestras de *Colletotrichum* provenientes de tubérculos con síntomas de paño de la papa amplificados con oligonucleótidos de gliceraldheido-3-fosfato deshidrogenasa (GPD). Gel de agarosa al 1%, donde M, corresponde al marcador molecular 1Kb, carril 1: aislado (1C), carril 2: aislado (1.1C) y carril 3: aislado (3C), carril 4: control negativo, carril 5: aislado (1C), carril 6: aislado (1.1) y carril 7: aislado (3C), amplificados con oligonucleótidos de la actina (ACT512F/ACT783R).

7.2.2. Análisis filogenético

El análisis filogenético de las tres secuencias de los productos amplificados de interés, obtenidas en este trabajo fueron alineadas con secuencias de ITS, ACT y GAPDH publicados para aislados agrupados de especies de *Colletotrichum* ya existentes reportadas en el banco de datos del NCBI, con las que se observó un alto porcentaje de similitud (mayor al 95%), mediante la comparación de secuencias con las ya reportadas en la base de datos del NCBI. La inclusión de secuencias de referencia en el análisis filogenético permitió corroborar la identidad de estás y organizarlas en sus grupos correspondientes.

El árbol construido con base en la región ITS-GPD, se agrupo la especie tipo a *Colletotrichum coccodes*. Los tres aislados obtenidos en tubérculos sintomáticos con paño de la papa, del municipio de Ahome; fueron asignados dentro del clado de las accesiones de *Colletotrichum coccodes* reportadas en el NCBI (Figura 8).

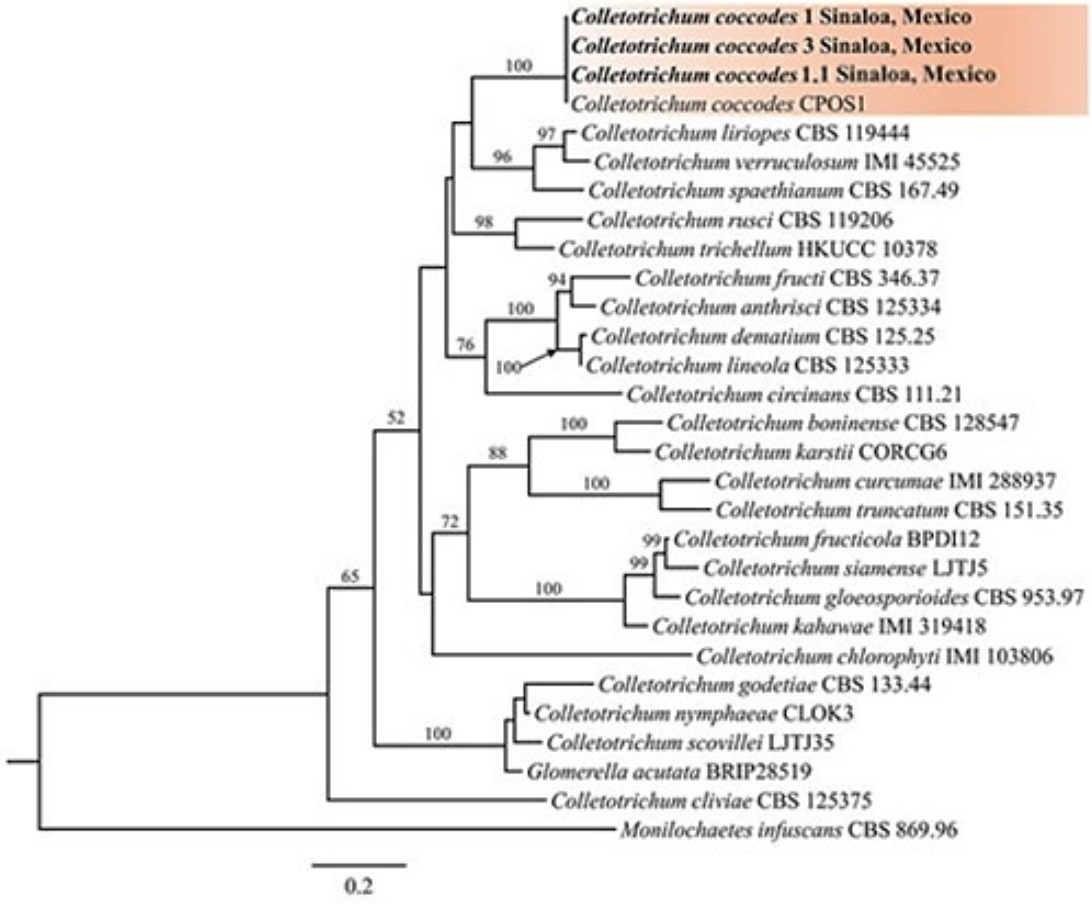

Figura 8. Árbol filogenético de tres aislados de *Colletotrichum coccodes* obtenidos de tubérculos con síntomas de paño de la papa, del municipio de Ahome. Análisis de máxima verosimilitud mediante búsqueda heurística con las secuencias concatenadas de los genes GPD e ITS4/ITS5. En negritas se muestran los aislados evaluados en esta investigación. Los valores bootstrap se muestran como porcentaje en los nodos. La escala representa el promedio.

7.3 Pruebas de patogenicidad en papa

A los 105 dds todos los tubérculos presentaron manchas oscuras (paño de la papa) en la piel, mientras que los tubérculos testigos permanecieron libres de la enfermedad (Figura 9), lo que confirmó la patogenicidad de los tres aislados. La superficie promedio dañada en los tubérculos varió de 21.5 a 30.0 cm^2, sin diferencias significativas entre los aislados de *C. coccodes*, pero si hubo diferencias significativas ($p<0.0001$) con respecto a los tuberculos testigo los cuales no presentaron síntomas de la enfermedad durante el periodo experimental. Los postulados de Koch se cumplieron mediante el reaislamiento de los aislados del tejido asintomático de los tubérculos los cuales provienen de tubérculos sintomáticos con paño de la papa, del municipio de Ahome, Sinaloa y la severidad se cuantificó expresada en cm^2 (Cuadro 3).

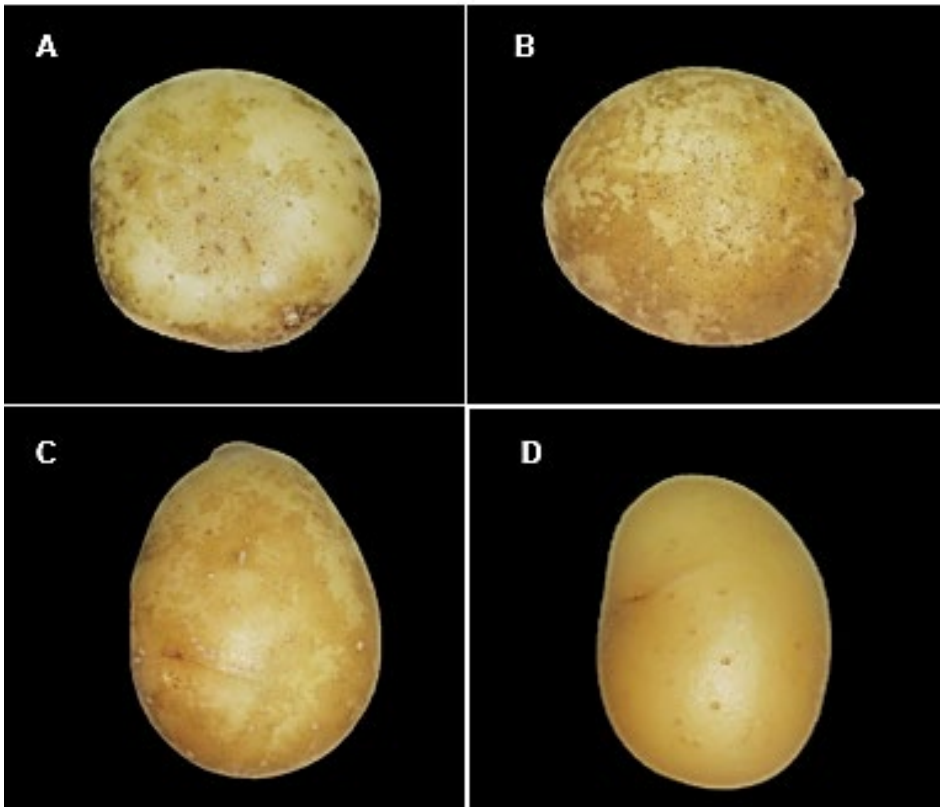

Figura 9. Lesiones necróticas típicas del paño de la papa en tubérculos causados por los aislados de *Colletotrichum coccodes* A) aislado 1C; B) aislado 1.1C, C) aislado 3C y D) tubérculo sano cosechado de plantas testigo sin inoculación.

Cuadro 3. Patogenicidad de tres aislados de *Colletotrichum coccodes* en tubérculos de papa variedad Fianna.

Aislado	Lesión en tubérculos al momento de la cosecha [x]
1C	22.5 b *
1.1C	22.5 b
3C	30.0 b
Testigo sin inoculación	00.0 a

[X] Lesiones (de paño de la papa) expresadas en cm^2 al momento de la cosecha (105 días después de la siembra).

[*] Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de significancia $p>0.05$.

7.3.1 Evaluación de patogenicidad de aislados de *Colletotrichum coccodes* en plantas de papa

La patogenicidad de los aislados del hongo también se determinó mediante la observación de acérvulos en el tallo de las plantas de papa. Los resultados indicaron que los aislados producen abundantes acérvulos en los tallos infectados al nivel del suelo y hasta los 20 cm de altura sobre el mismo (Figura 10). Las escalas de evaluación para dicho propósito indicaron el nivel 4 pues la superficie de los tallos inoculados con los aislados 1C, 1.1C y 3C presentaban de 51 al 75% de presencia de acérvulos, con los tres aislados. No hubo diferencias significativas entre los tres aislados en la capacidad para producción de acérvulos sobre el tejido infectado; pero si hubo diferencias significativas ($p<0.0001$) con respecto a las plantas testigo sin inoculación las cuales no presentaron las estructuras en mención (Cuadro 4).

Cuadro 4. Severidad de los aislados de *Colletotrichum coccodes* en tallos de papa variedad Fianna en Ahome, Sinaloa.

Aislado	Severidad [x]
1C	4 b *
1.1C	4 b
3C	4 b
Testigo sin inoculación	0 a

[x] Severidad (del paño de la papa) expresadas mediante una escala visual 0 a 5 (densidad de acérvulos) donde 0= sin acérvulos, 1= 1 a 10%, 2= 11 a 30%, 3= 31 a 50%, 4= 51 a 75% y 5= 76 a 100%.

[*] Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de significancia p>0.05.

Figura 10. Prueba de patogenicidad en: A) plantas de papa var. Fianna, B) tallo de papa var. Fianna con presencia de acérvulos causados por los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes*.

7.4. Evaluación de patogenicidad de aislados de *Colletotrichum coccodes* en plantas de tomate.

7.4.1. Peso fresco de follaje

Las plantas de tomate inoculadas con los aislados 1C, 1.1C y 3C de *C. coccodes* no mostraron síntomas de amarillamiento ni marchitez a los 150 ddi. Las plantas inoculadas mostraron una coloración normal en el follaje (Figura 11A); sin embargo, presentaron acérvulos en las raíces (Figura 11B), pero no en los tallos. El peso fresco del follaje de las plantas inoculadas y las plantas testigo varió de 98.5 a 127 g por lo cual si hubo diferencias significativas (p=0.0110) entre el peso promedio de las plantas inoculadas con el aislado 3C y el 1.1C y las plantas testigo. El peso fresco del follaje de 98.5 a 127 g, el aislado 1C presentó diferencias estadísticas significativas (P<0.05) con respecto al testigo, pero no con los aislados 1.1C y3C, los cuales se comportaron igual que el testigo (Cuadro 5).

El peso fresco de la raíz varió de 0.7 a 1.3 g en las plantas inoculadas con los mismos aislados y las plantas testigo sin inoculación. Pero no hubo diferencias significativas (p<0.1250) entre los tratamientos aun cuando mostraron presencia de acérvulos en la raíz (Cuadro 6).

Cuadro 5. Efecto de la severidad de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes* en el peso fresco del follaje de tomate DRD 8551.

Aislado	Peso fresco de follaje de tomate (g) [x]
1C	127.0 b *
1.1C	118.5 ab
3C	106.0 ab
Testigo sin inoculación	98.5 a

[x] Peso fresco del follaje de tomate al inicio de la fructificación (150 días después de la inoculación).

*Medias con letras distintas presentan diferencias estadísticas (Tukey. P<0.05).

Cuadro 6. Efecto de la severidad de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes* en el peso fresco de raíz en tomate.

Aislado	Peso fresco de raíz de tomate (g) [x]
1C	1.3 a *
1.1C	0.7 a
3C	1.2 a
Testigo sin inoculación	1.2 a

[x] Peso de raíz de tomate al inicio de la fructificación (150 días después de la inoculación).

*Medias con letras distintas presentan diferencias estadísticas (Tukey. P<0.05).

7.4.2. Presencia de acérvulos en raíces

Al evaluar la densidad de acérvulos en las raíces de las plantas de tomate, inoculadas con los aislados 1C, 1.1C y 3C de *C. coccodes,* mediante una escala del 0 a 5, se observó que los tres aislados produjeron acérvulos en las raíces lo que alcanzó el nivel 3 en dicha escala lo cual corresponde del 31 a 50% de las raíces con presencia de dichas estructuras del hongo. No hubo diferencias significativas en la densidad de acérvulos producidos por los aislados, pero si las hubo con respecto al testigo (p=0.0001) donde no se observaron las estructuras del patógeno (Cuadro 7).

Cuadro 7. Severidad de los aislados de *Colletotrichum coccodes* en raíz de tomate híbrido DRD 8551 en Ahome, Sinaloa.

Aislado	Severidad [x]
1C	3 b *
1.1C	3 b
3C	3 b
Testigo sin inoculación	0 a

[x] Severidad (antracnosis) expresadas mediante una escala visual 0 a 5 (densidad de acérvulos) donde 0= sin acérvulos, 1= 1 a 10%, 2= 11 a 30%, 3= 31 a 50%, 4= 51 a 75% y 5= 76 a 100%.

[*] Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas con respecto al nivel de significancia p>0.05.

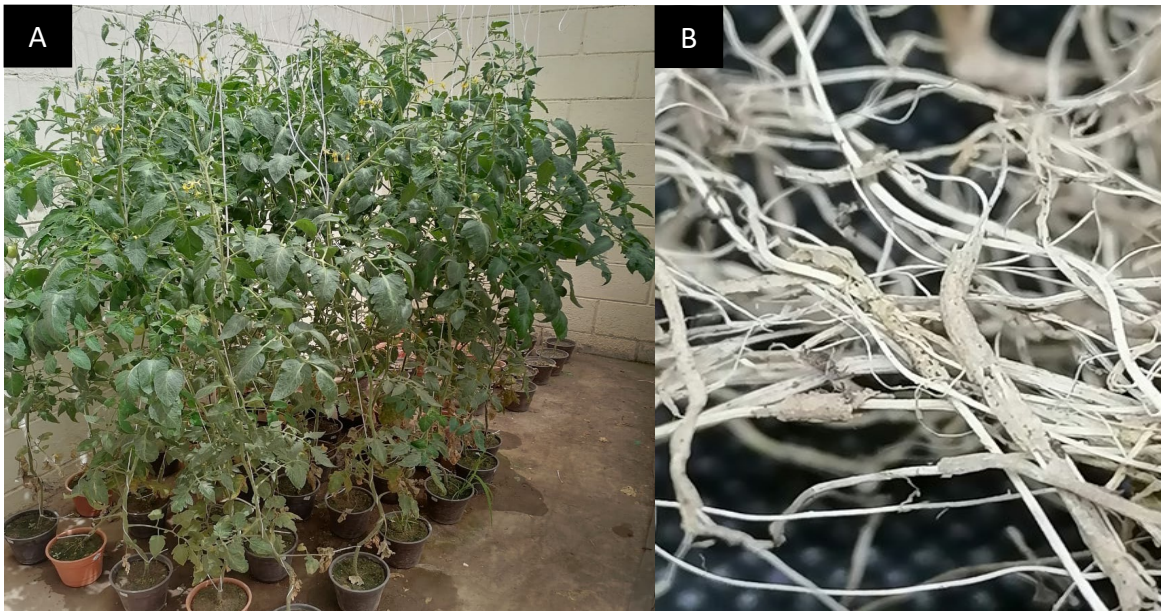

Figura 11. Prueba de patogenicidad en: A) plantas de tomate híbrido DRD 8551, B) raíz de tomate híbrido DRD 8551 con presencia de acérvulos causados por los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes*.

7.5. Evaluación de patogenicidad de aislados de *Colletotrichum coccodes* en plantas de chile

7.5.1. Peso fresco de follaje y raíz

Las plantas de chile inoculadas con los aislados 1C, 1.1C y 3C de *C. coccodes* no mostraron síntomas de amarillamiento ni marchitez a los 150 ddi. Las plantas inoculadas mostraron vigor y coloración normal del follaje al compararlas con las plantas testigo (Figura 12A); sin embargo, presentaron acérvulos en las raíces (Figura 12B), pero no en los tallos. El peso fresco del follaje de las plantas inoculadas y las plantas testigo varió de 16.0 a 28.4 g no hubo diferencias significativas entre el peso fresco promedio del follaje de las plantas inoculadas con el aislado 1.1C, testigo sin inoculación y 3C, pero si las hubo (p=0.0160) con respecto a las plantas inoculadas con el aislado 1C cuyo peso promedio de follaje fue de 28.4 g Cuadro 8). Así mismo, el peso fresco de la raíz de las mismas plantas varió de 0.7 a 1.0 g en las plantas inoculadas con los mismos aislados y las plantas testigo sin inoculación. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos aun cuando mostraron presencia de acérvulos en la raíz (Cuadro 9).

Cuadro 8. Efecto de la severidad de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes* en el peso fresco del follaje del chile híbrido plata.

Aislado	Peso fresco del follaje del chile (g) [X]
1C	28.4 b *
1.1C	16.0 a
3C	21.4 ab
Testigo sin inoculación	19.0 ab

[X] Peso fresco del follaje de chile híbrido plata al inicio de la fructificación (150 días después de la inoculación).

*Medias con letras distintas presentan diferencias estadísticas respecto al nivel de significancia (Tukey. P<0.05).

Cuadro 9. Efecto de la severidad de los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes* en el peso fresco de raíz de chile híbrido plata.

Aislado	Peso fresco de raíz de chile (g) [x]
1C	1.0 a *
1.1C	0.7 a
3C	0.7 a
Testigo sin inoculación	0.8 a

[X] Peso de raíz de chile híbrido plata al inicio de la fructificación (150 días después de la inoculación).

* Medias con letras distintas presentan diferencias estadísticas respecto al nivel de significancia (Tukey. P<0.05).

7.5.2. Presencia de acérvulos en raíces

Al evaluar la densidad de acérvulos en las raíces de las plantas de chile inoculadas con los aislados 1C, 1.1C y 3C de *C. coccodes,* mediante una escala del 0 a 5, se observó que los tres aislados produjeron acérvulos en las raíces. La densidad de acérvulos en las raíces alcanzó niveles de 2 (11 a 30%) a 3 (31 a 50%) con presencia de dichas estructuras del hongo. No hubo diferencias significativas en la densidad de acérvulos producidos por los aislados, pero si las hubo ($p<0.0001$) con respecto al testigo donde no se observaron las estructuras del patógeno (Cuadro 10).

Cuadro 10. Severidad de los aislados de *Colletotrichum coccodes* en raíz de chile híbrido plata en Ahome, Sinaloa.

Aislado	Severidad [x]
1C	3 b *
1.1C	3 b
3C	2 b
Testigo sin inoculación	0 a

[x] Severidad (antracnosis) expresadas mediante una escala visual 0 a 5 (densidad de acérvulos) donde 0= sin acérvulos, 1= 1 a 10%, 2= 11 a 30%, 3= 31 a 50%, 4= 51 a 75% y 5= 76 a 100%.

[*] Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas con respecto al nivel de significancia $p>0.05$.

Figura 12. Prueba de patogenicidad en: A) plantas de chile híbrido plata, B) raíz de chile híbrido plata con acérvulos del hongo causados por los aislados 1C, 1.1C y 3C de *Colletotrichum coccodes*.

7.6. Efectividad biológica *in vitro* de fungicidas

7.6.1. Efectividad biológica contra el aislado 1C

En general todas las dosis de los fungicidas ensayadas excepto la dosis baja del hidróxido cúprico (100.0 ppm), inhibieron el crecimiento micelial del aislado 1C de *C. coccodes,* sobresalió por su eficacia el fungicida procloraz a las dosis de 0.1, 0.5, 1.0, 10.0 y 100.0 ppm, pues el diámetro de las colonias del hongo en las cajas de Petri con PDA a dichas dosis fue de 18.0, 12.4, 6.7, 5.0 y 5.0 mm en forma respectiva (Figura 13). No hubo diferencias significativas entre estos tratamientos. Las dosis de 2.0, 3.0, 5.0 y 10.0 ppm de propiconazol también ejercieron un marcado efecto inhibitorio del hongo pues el diámetro de las colonias fue de 17.2, 11.1, 6.0 y 5.8 mm en forma respectiva (Figura 14). De igual forma el hidróxido cúprico a la dosis más alta (1000.0 ppm), inhibió el crecimiento micelial del patógeno pues mostró colonias de 6.4 mm de diámetro después de 10 días de incubación en el medio de cultivo PDA con el fungicida (Figura 17). Es importante señalar que la dosis de los fungicidas en mención, no mostraron diferencias significativas ($p<0.0001$).

El metil-tiofanato a las dosis de 100.0, 150.0, 200.0, 300.0 y 500.0 ppm y la dosis más baja del propiconazol (1.0 ppm) ejercieron efecto inhibitorio ya que el diámetro de las colonias fue de 27.0, 30.8, 28.3, 28.4, 26.1 y 28.0 mm de forma respectiva, con diferencias significativas entre estos tratamientos (Figura 14 y 15).

La dosis del fungicida fluoxastrobin a las dosis de 1.0, 5.0, 10.0, 100.0 y 300.0 así como el hidróxido cúprico a las dosis de 100.0, 300.0 y 400.0 ppm tuvieron el menor efecto inhibitorio pues el diámetro de las colonias en el medio de cultivo con dichas dosis varió de 35.2 a 79.0 mm, y no mostraron diferencias significativas con respecto a las colonias en las cajas de Petri testigo sin fungicida, las cuales mostraron un diámetro de 79.4 mm sin diferencias significativas en el diámetro de las colonias después de 10 días de incubación(Figura 16 y 17). Este grupo de tratamientos mostró diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Inhibición *in vitro* de *Colletotrichum coccodes* aislado 1C por varias dosis de cinco fungicidas.

Fungicida/Dosis (ppm)	Crecimiento micelial en (mm) [x]
Procloraz	
0.1	17.9 abcdef *
0.5	12.4 abcde
1	6.7 abc
10	5.0 a
100	5.0 a
Propiconazol	
1	27.9 cdefgh
2	17.2 abcdef
3	11.1 abcd
5	6.0 ab
10	5.7 a
Metil-tiofanato	
100	27.0 bcdefg
150	30.8 efghij
200	28.2 cdefgh
300	28.4 defghi
500	26.1 bcdefg
Fluoxastrobin	
1	58.9 jk
5	52.7 hijk
10	42.1 ghijk
100	36.6 ghijk
300	35.2 fghijk
Hidróxido cúprico	
100	79.0 k
300	55.4 ijk
400	57.2 ijk
500	32.3 fghij
1000	6.3 ab
Testigo sin fungicida	79.4 k

[x]Crecimiento micelial expresado en milímetros del aislado 1C de *Colletotrichum coccodes*

*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales al nivel de significancia p>0.05.

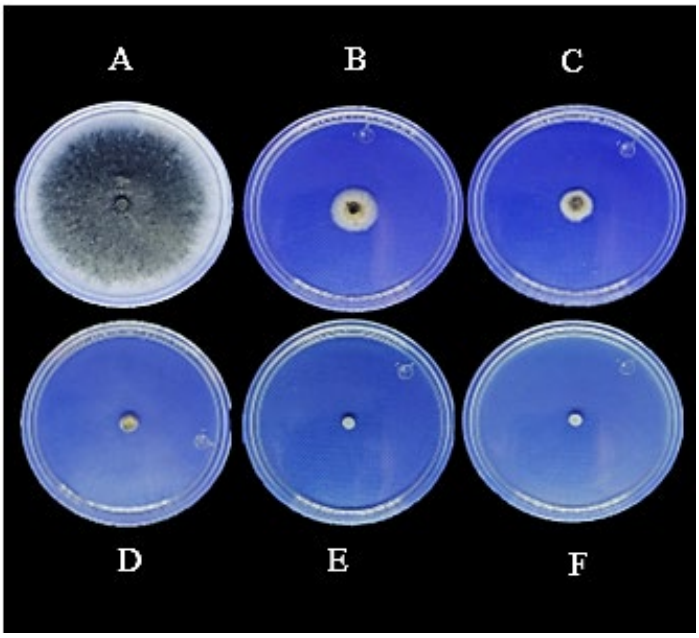

Figura 13. Efectividad biológica del fungicida procloraz sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 0.1 ppm. C) 0.5 ppm. D) 1 ppm. E) 10 ppm. F) 100 ppm.

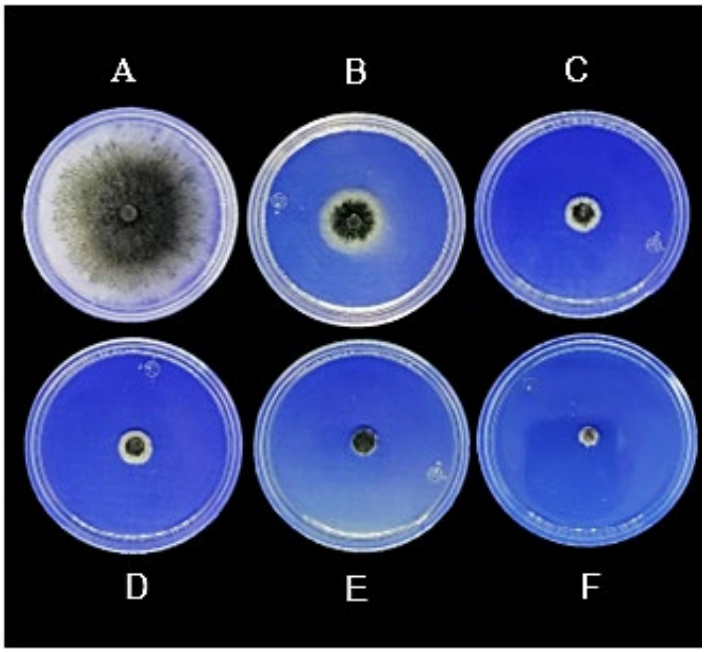

Figura 14. Efectividad biológica del fungicida propiconazol sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 1 ppm. C) 2 ppm. D) 3 ppm. E) 5 ppm. F) 10 ppm.

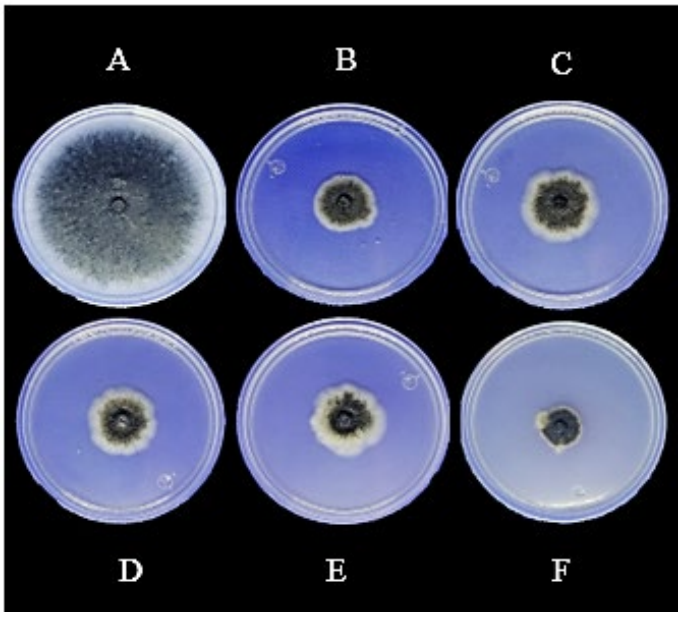

Figura 15. Efectividad biológica del fungicida metil-tiofanato sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 100 ppm. C) 150 ppm. D) 200 ppm. E) 300 ppm. F) 500 ppm.

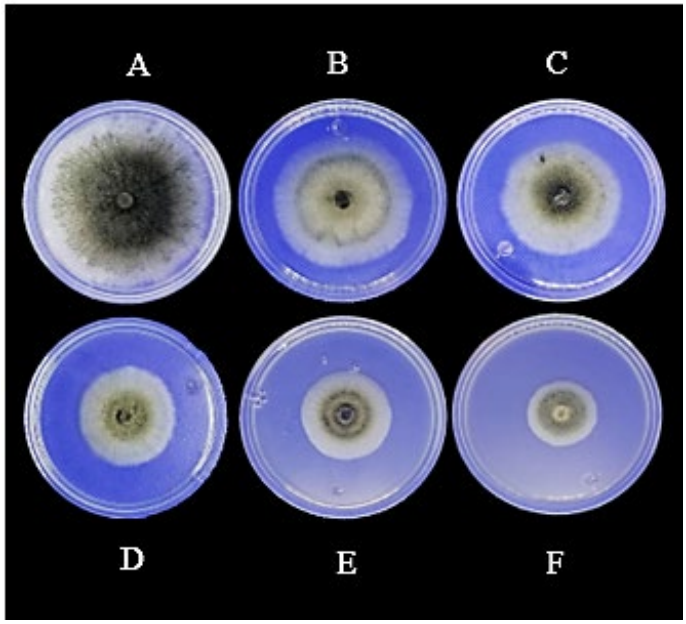

Figura 16. Efectividad biológica del fungicida fluoxastrobin sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 1 ppm. C) 5 ppm. D) 10 ppm. E) 100 ppm. F) 300 ppm.

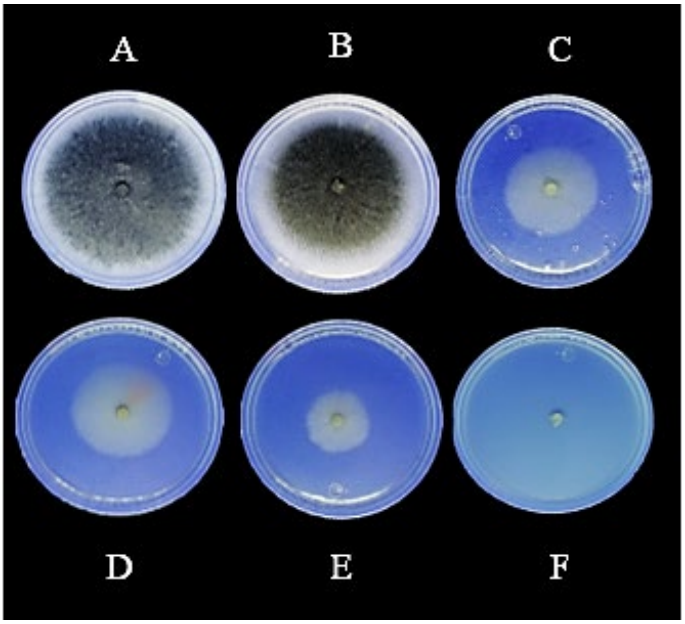

Figura 17. Efectividad biológica del fungicida hidróxido cúprico sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Colletotrichum coccodes* de la concentración menor a la mayor. A) Testigo. B) 100 ppm. C) 300 ppm. D) 400 ppm. E) 500 ppm. F) 1000 ppm.

7.7. Ensayo de antagonismo de *Bacillus cereus* contra *Colletotrichum coccodes*

El efecto ihhibitorio *in vitro* de *B. cereus* contra el aislado 1C de *C. coccodes* fue evidente ya que hubo una disminucion del crecimiento micelial del hongo a los ocho dias despues de la siembra en PDA. El radio micelial en cultivos duales con la bacteria a partir de un cultivo de 48 h de edad y la misma bacteria en formulacion en polvo humectable fue de 2.1 y 2.3 cm, en forma respectiva. No hubo diferencias significativas (P>0.05) entre estos tratamientos, pero si las hubo con respecto al radio del crecimiento micelial al confrontarse con el polvo humectable que acompañó como inerte la formulacion con la bacteria, donde el radio del crecimiento micelial fue de 3.0 cm y el crecimiento del hongo sin presencia de bacterias, ni el inerte donde el crecimiento fue de 3.0 (Cuadro 12; Figura 18).

Cuadro 12. Inhibición *in vitro* de *Bacillus cereus* contra el aislado 1C de *Colletotrichum coccodes*.

Tratamientos	Crecimiento micelial (cm) [x]
Suspensión bacteriana, *B. cereus* [y]	2.1 a *
B. cereus + polvo humectable	2.3 a
Polvo humectable sin bacteria	3.0 b
Crecimiento micelial sin bacteria	3.0 b

[y]Suspensión de la bacteria de 48 horas de edad.

[x]Crecimiento micelial expresado en centimetros del aislado 1C de *Colletotrichum coccodes*;

*Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de significancia p>0.05

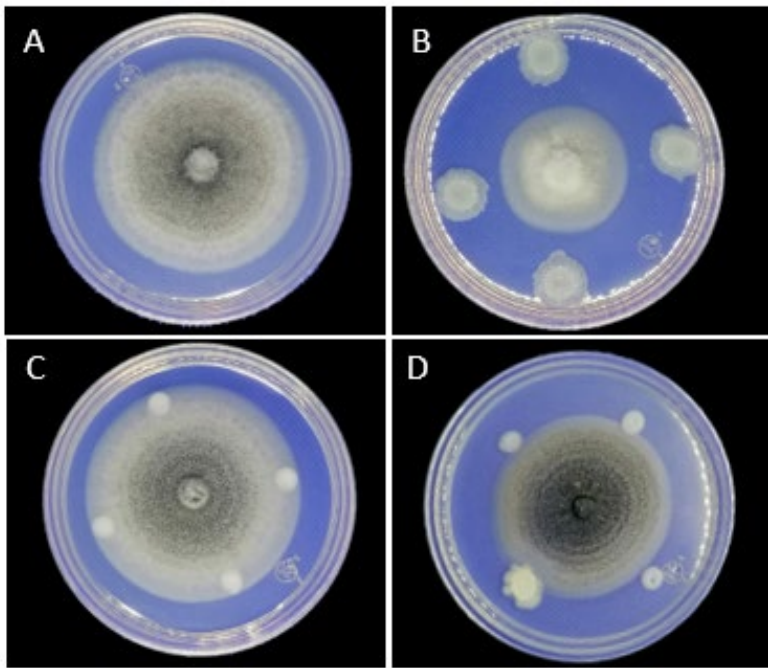

Figura 18. Efectividad biológica de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum coccodes*. A) crecimiento micelial sin bacteria, B) suspensión bacteriana *B. cereus*, C) polvo humectable sin bacteria y D) *B. cereus* + polvo humectable.

VIII. DISCUSION

De tubérculos de papa var. Fianna se obtuvieron tres aislados de un hongo con características similares. Las colonias en medio de cultivo PDA mostraron un crecimiento micelial denso y además presentaron una mayor variación en la coloración debido a que se observan colonias, de grisáceo a negro. Las características fenotípicas de las colonias, y de los conidios así como la tasa de crecimiento micelial en PDA coincidieron con los rangos reportados para *C. coccodes* por (Rojo *et al*., 2017; Nieto *et al*., 2019; Pérez *et al*., 2019); sin embargo, las características morfológicas no son suficientes para la identificación del hongo en mención ya que la morfología del organismo puede variar debido al efecto de las condiciones de temperatura, medios de cultivo, regímenes de luz y la continua transferencia del hongo al medio de cultivo (Cannon *et al*., 2000, 2012; Cai *et al*., 2009). Por lo anterior, se ha recurrido a herramientas moleculares para la identificación de especies del género *Colletotrichum* (Masel *et al*., 1990; Mills *et al*., 1992; Hodson *et al*., 1993; Sheu *et al*., 2020). En el presente trabajo la identificación de los tres aislados obtenidos de tubérculos con síntomas de paño de la papa del municipio de Ahome, se realizó mediante la utilización de los cebadores universales ITS4/ITS5, ACT y GPD (White *et al*., 1990). Las secuencias de los tres aislados de *C. coccodes* obtenidos se compararon con especies de *Colletotrichum* ya registradas en el banco de genes donde las secuencias de los tres aislados se ubicaron en el grupo de *C. coccodes* y esto nos permite confirmar la identidad de *C. coccodes* asociado al paño de la papa en el norte de Sinaloa, coincidiendo con estudios previos realizados por (Pérez *et al*., 2019), los cuales realizaron el primer reporte del fitopatógeno en Sinaloa.

Se confirmó la patogenicidad de *C. coccodes* (aislados 1C, 1.1C y 3C), en papa, pues estos causaron el típico paño de la papa en los tubérculos, lo cual coincide en estudios previos sobre este patógeno en esta solanácea en Sinaloa (Pérez *et al*., 2019), Estados Unidos de Norte América, (Alananbeh y Gudmestad, 2016) y en algunos países europeos (Peters *et al*., 2016; Belov *et al*., 2017; Cakir *et al*., 2019).

En relación a la patogenicidad del hongo en tomate del híbrido DRD 8551, fue interesante observar que las plantas que crecieron en suelo infestado con el patógeno no mostraron síntomas de amarillamientoy de marchitez durante el periodo experimental; sin embargo, se observó reproducción abundante de acérvulos en tejido cortical de las raíces, pero no en el tallo de las plantas, lo que sí ocurrió en las plantas de papa.

Los resultados indicaron que la presencia de los acérvulos en la raíz no afectó el vigor de las plantas de tomate pues estas mostraron un color normal durante su desarrollo, además de que el peso fresco del follaje no se redujo al crecer en suelo infestado con los diferentes aislados del hongo. El aspecto normal de las plantas de tomate en suelo infestado con el patógeno contrasta con reportes previos donde la raíz exhibió áreas necróticas de color marrón a oscuro con bandas, con agrietamientos longitudinales y laterales, lo cual condujo a un crecimiento limitado de las raíces de tomate y chile (Byrne *et al*., 1998; Gilardi *et al*., 2013; Vrisman *et al*., 2016; Belov *et al*., 2017). De manera similar las plantas de chile del híbrido plata, también mostraron presencia de acérvulos en el tejido cortical de la raíz, pero no mostraron amarillamiento ni marchitez tal como ocurrió en tomate cuando crecieron en suelo infestado con los tres aislados de *C. coccodes*. Estos resultados también contrastan con reportes previos donde el hongo causa lesiones hundidas de color marrón, con daño y decoloración en raíces de chile (Sharma *et al*., 2011; Tyvaert *et al*., 2019). Aunque también causa lesiones en tallos y en frutos (Jamiolkowska *et al*., 2018).

En el presente estudio ninguno de los aislados de *C. coccodes* causó síntomas en tallos, o raíces de papa, tomate y chile. Estudios adicionales se deberán de llevar a cabo para producir plantas de tomate y chile en invernadero y determinar si el patógeno causa síntomas en diferentes grados de madurez de los frutos lo cual ha ocurrido en estudios previos (Alkan *et al*., 2008; Sharma *et al*., 2011; Nieto *et al*., 2019) en chile y tomate. Aun cuando los aislados 1C, 1.1C y 3C de *C. coccodes*, fueron patogénicos en papa, y produjeron acérvulos en el tejido cortical de las raíces de tomate y chile, éstas no mostraron síntomas aéreos. Este hallazgo es relevante pues desde un punto de vista práctico la rotación de éstas solanáceas no es recomendable como estrategia para el manejo de la enfermedad.

El inoculó producido en las plantas de tomate y chile podría causar la enfermedad del paño de la papa en esta solanácea en ciclos agrícolas subsiguientes. En este sentido, se abren líneas de investigación, para determinar el efecto de la rotación de cultivos con gramíneas, para determinar su efecto en la disminución de las poblaciones de *C. coccodes* en el suelo como estrategia para el manejo de la enfermedad.

A través del tiempo diversos estudios señalan el efecto de fungicidas en el manejo de la enfermedad del paño de la papa, causado por *C. coccodes.* El fungicida procloraz es uno de ellos el cual inhibe la enzima lanosterol 14 a-desmetilasa (CYP51A1), la cual participa en la producción del ergosterol, que es un elemento esencial en la membrana de los hongos. Este fungicida se caracteriza por ser de amplio espectro con actividad protectora y curativa (Darbre, 2015). Marais (1990) evaluó la efectividad *in vitro* de 33 fungicidas contra *C. coccodes* dentro de los cuales se incluyeron el procloraz, propiconazol, óxido cúprico entre otros, las evaluaciones se llevaron a cabo *in vitro;* dentro de los fungicidas ensayados el procloraz resultó con una mayor eficacia. En un experimento similar Read y Hide (1995), evaluaron el efecto de 10 fungicidas en el que procloraz sobresalió por su eficacia en las mismas condiciones de prueba. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, donde procloraz presentó el mayor efecto inhibitorio *in vitro* contra *C. coccodes*. Por otro lado, el metil-tiofanato mostró un efecto moderado *in vitro* contra *C. coccodes* en el presente estudio, lo cual coincide con la efectividad biológica que el thiabendazol (perteneciente al grupo de los benzimidazoles donde se ubica el metil-tiofanato) el cual mostró efectividad biológica contra el mismo patógeno *in vitro* (Uribe y Loria, 1994). En relación al fungicida propiconazol, su efecto *in vitro* contra *C. coccodes* fue evidente en las dosis de 2.0, 3.0, 5.0 y 10.0 ppm, lo cual coincide con los resultados obtenidos por (Read y Hide, 1995) donde observaron que este fungicida a concentraciones mayores de 10 ppm, contra el mismo patógeno, lo que contrasta con los resultados del presente estudio, donde el fungicida mostró eficacia en las dosis de 2.0, 3.0, 5.0 y 10.0 ppm. En el presente estudio el hidróxido cúprico, así como el fluoxastrobin ejercieron inhibición moderada *in vitro* de *C. coccodes,* tal como se ha consignado contra *C. acutatum* (Guillen *et al*., 2017).

Estudios adicionales sobre la efectividad biológica *in vitro* de fungicidas de estos grupos químicos deberán realizarse en los estudios futuros. En vista de que no hay variedades con resistencia genética al paño de la papa, causado por *C. coccodes*, líneas futuras de investigación deberán incluir trabajos de efectividad biológica a nivel de campo de los fungicidas ensayados *in vitro* en el presente estudio. También se deberá determinar la efectividad de organismos con potencial antagónico en campo contra el patógeno.

IX. CONCLUSIÓN

Los hongos asociados a síntomas de paño en tubérculos de papa en el norte de Sinaloa, fueron identificados como *C. coccodes* en base a su caracterización morfológica y el análisis filogenético.

Un aislado representativo del *C. coccodes* mostró altos niveles de sensibilidad *in vitro* a los fungicidas procloraz, propiconazol y a altas dosis de hidróxido cúprico. Mientras, que el mismo aislado mostró sensibilidad moderada a los fungicidas metil-tiofanato, fluoxastrobin.

La bacteria *Bacillus cereus* también mostró inhibición *in vitro* a *C. coccodes*, lo cual fue más evidente cuando la bacteria se utilizó a partir de cultivos de 48 h, que cuando se utilizó en formulación en polvo humectable.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abang M, Winter S, Mignouna H, Green K and Asiedu R. 2003. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. AJB 2 (12) 486-496.

Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier academic press.

Alananbeh KM and Gudmestad NC. 2016. Genetic diversity of *Colletotrichum coccodes* in the United States using amplified fragment length polymorphism analysis. J Gen Plant Pathol 82, 199-211. https:/doi.org/10.1007/s10327-016-0662-y.

Aliyu TH, Balogun OS and Adesina OM. 2012. Effect of *Pythium aphanidermatum* on two cultivars of pepper (*Capsicum* spp.). Nigerian Journal of Agriculture 8 (49), 64-69.

Alkan N, Fluhr R, Sherman A and Prusky D. 2008. Role of ammonia secretion and ph modulation on pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* of tomato fruit. Molecular Plant-Microbe Interactions 21: (8), 1058-1066. https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1058.

Alkher H, Hadrami EL, Rashid KY, Adam LR and Daayf F. 2009. Cross-pathogenicity of *Verticillium dahliae* between potato and sunflower, 124 (3), 505-519. https://doi.org/10.1007/s10658-009-9437-z.

Andrivon D, Lucas M, Guérin C and Jouan B. 1998. Colonization of roots stolons, tubers and stems of various potato (*Solanum tuberosum*) cultivars by the black-dot fungus *Colletotrichum coccodes*. Plan Pathology 47: 440-445. https://doi:10.1046/j.13653059.1998.00267.x.

Apodaca SMA, Zavaleta ME, Osada KS, García ER and Valenzuela UJG. 2001. Comparacion de Técnicas para evaluar *in vitro* la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y efecto de la temperatura.

Belov GL, Belosokhov AF and Kutuzoya IA. 2017. *Colletotrichum coccodes* in potato and tomato leaves in Russia. J plant Dis Prot 125:311-317. https://doi:10.1007/s41348-017-0138-0.

Belle C, Ferraz RR, Moccellin R and Jacobsen FCR. 2020. Detection of *Colletotrichum coccodes* causing leaf anthracnose on *Pisum sativum* in southern Brazil. J Plant Pathol 102,255. https://doi.org/10.1007/s42161-019-00392-6.

Ben D, Zvi B and Tsror L. 2009. An improve large-scale screening method for assessment of *Colletotrichum coccodes* aggressiveness using mature green tomatoes. Plant Pathology 58 497-503. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.0989.x.

Benítez S, Bentley J, Bustamante P, Sánchez LC y Corrales L. 2007. "Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo", NOVA vol. 5, pp. 147-153.

Bjorsell P, Edin E and Viketoft M. 2017. Interactions between some plant-parasitic nematodes and *Rhizoctonia solani* in potato fields. Applied Soil Ecology 113, 151-154. https://doi:10.1016/j.apsoil.2017.02.010.

Brierley JL, Hilton AJ, Wale SJ, Peters JC, Gladders P, Bradshaw NJ, Ritchie F, Mackenzie K and Lees AK. 2014. Factors affecting the development and control of black dot on potato tubers. Plant Pathology 64, (1), 167-177. https://doi.org/10.1111/ppa.12238.

Byrne JM, Hausbeck MK, Meloche C and Jarosz AM. 1998. Influence of dew period and temperatura on foliar infection of greenhouse-grown tomato by *Colletotrichum coccodes*. Plant Disease 82, 639-641. https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.6.639.

CABI 2020. Internacional agricultural bioscience center. Disponible en: https://www.cabi.org/isc/datasheet/31837. Consultado en: septiembre 2021.

Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir BS, Waller JM, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, Mckenzie EHC and Johnston PR. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39:183-204. Disponible en línea: http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-8. Pdf.

Cakir E, Karahan A and Kurbetli I. 2019. Involvement of *Colletotrichum coccodes* causing atypical symptoms of potato tubers in Turkey. J Plant Dis Prot 126, 173-176 https://doi.org/10.1007/s41348-019-00206-y.

Cannon P, Bridge P and Monte E. 2000. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics *Colletotrichum*: host specifity, pathology and host pathogen interaction. Cabi Biosciences APS Pres St. Paul, MN. 1:1-20

Cannon PF, Damm U, Johnston PR and Weir BS. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. Studies in Mycology 73: 181-213. http://dx.doi.org/10.3114/sim0014.

Capsicum annuum L. in GBIF Secretariat. 2021. GBIF Backbone txonimy checklist dataset. https://doi.org/10.15468/39 Accessed via GBIF.org on 2021-06-11.

Carbone I and Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomicetes. Mycologia 91: 553-556. https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051

Cardona AS, Castaño ZJ and Arango IR. 2008. Caracterización del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. Rev. Acad. Colomb. Cienc 32 (123): 145-156.

Cardona PLF, Castaño ZJ y Ceballos AN. 2016. Epidemiología del tizon tardío [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] en quice introducciones de tomate silvestre. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient 19 (1): 45-54.

Carmona SL, Villarreal NA, Burbano DD y Soto SM. 2020. Cambios fisiológicos y mecanismos genéticos asociados a la marchitez vascular causada por *Fusarium* en tomate. Revista Temas Agrarios 25: (2), 166-189. https://doi.org/10.21897/rta.v25i2.2457.

Caruso A, Licciardello G, Rosa R, Catara V and Bella P. 2016. Mixed infection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and P. *carotovorum* subsp. *brasiliensis* in tomato stem rot in Italy. Journal of Plant Pathology 98 (3) 661-665.

Castro RA, Fernandez PSP and Osuna AP. 2012. Chili defense mechanisms in the *Capsicum annuum- Phytophthora capsici* pathosystem. Rev. Mex. Fitopatol Vol.30 (1), 49-65.

Costa MHD, Pfenning LH. y Poza EA. 2006. *Colletotrichum coccodes*, patógeno de plantas solanáceas no Brasil. Fitopatología Brasileira 31 (3).

Cuesta X, Rivadeneira J y Monteros C. 2014. Mejoramiento genético de papa: conceptos, procedimientos, metodologías y protocolos. Inst. Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP Quito, Ecuador. 62p.

Darbre PD. 2015. Endocrine disruption and human health. New York: Academic. Overview of EDCs and human health which sets thecbigger picture.

Debbi A, Boureghda H, Monte E and Hermosa R. 2018. Distribution and genetic variability of *Fusarium oxysporum* asociated with tomato diseases in Algeria and a biocontrol strategy with indigenous *Trichoderma* spp. Frontiers in Microbiology 9. https://doi:10.3389/fmicb.2018.00282

Delices G, Leyva OOR, Mota VC, Núñez PR, Gámez PR, Meza PA y Serna LR. 2019. Biogeografia del tomate *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Solanaceae) en su centro de origen (sur de América) y de domesticación (México). Biología Tropical 67 (4):1023-1036.

Denner FDN, Millard CP and Wehner FC. 2000. Effect of soil solarisation and mouldboard ploughing on black dot of potato, caused by *Colletotrichum coccodes.* Potato Res 43, 195-201. https://doi:10.1007/BF02358079.

De Silva, Groenewald JZ, Crous PW, Ades PK, Nasruddin A, Mongkolporn O and Taylor PW. 2019. Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia. IMA Fungus 10, 8. https://doi:10.1186/s43008-019-0001-y.

De Souza F, Da Silva F, Da Silveira S, Kowata DL, Dos Santos C and Do Carmo M. 2018. Conidial sporulation of *Stemphylium solani* under laboratory conditions and infectivity of inoculum produced *in vitro*. European Journal of Plant Pathology 152, 691-700. https://doi:10.1007/s10658-018-1511-y.

Dillard H. 1992. *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. In: J Bailey, M Jeger eds. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford, UK: CAB International. 225-236.

Dillard HR and Cobb AC. 1998. Survival of *Colletotrichum coccodes* in infected tomato tissue and in soil. Plant Disease 82 (2), 235-238). https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.235.

Duceppe M, Lafond L J, Palomares R, Sabeh M, Blok V, Moffett P and Mimee B. 2017. Analysis of survival and hatching transcriptomes from potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. Scientific Reports 7, 3882. https://doi:10.1038/s41598-017-03871-x.

Egúsquiza R. 2000. La producción de papa, tarnsformacion y comercialización. Centro internacional de la papa. Prisma- proyecto PRODECCE, Proyecto de papa andina, convenio MPS Adex- USAID. Consultado en agosto 2021, Disponible en://books.google.com.pe/books?id=6ciGbBX0uFwC&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.pp192

FAO. Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/origenes.html Consultado en septiembre 2021.

FAOSTAT. 2019. Disponible en: http://www.fao.org/faostat/es/home. Consultado en septiembre 2021.

Félix GR y Gálvez FCA. 2002. Control de mohonegro, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr) en el fruto de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) considerando unidades calor y variables ambientales para la aplicación de azoxystrobin en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 20: 72-76.

Fiers M, Chatot C, Edel-Hermann V, Le Hingrat Y, Konate AY, Gautheron N and Steinberg C. 2010. Diversity of microorganisms associated with atypical superficial blemishes of potato tubers and pathogenicity assessment. European Journal of Plant Pathology 128:353-371. https://doi.org/10.1007/s10658-010-9657-2.

Fiers M, Edel-Hermann V, Chatot C, Le Hingrat Y, Alabouvette C and Steinberg C. 2012. Potato soil-borne diseases. A review. Agronomy for Sustainable Development 32:93-132. https://doi.org/10.1007/s13593-011-0035-z.

Firman D and Allen E. 1993. Effects of windrowin, irriation and defoliation of potatoes on silver scurf (*Helmintosporium solani*) disease. The Journal of Agricultural Science 121 (1), 47-53. https://doi.org/10.1007/S00211859600076784

Flis L, Dobosz R, Rybarczyk MK, Wasilewska NB, Kubicz M and Winiszewska G. 2018. First report of the injury nematodes: *Pratylenchus brachyurus* and *Pratylenchus delattrei* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants in Mape verde. Institute of Parasitology SAS, Kosice. 55, 1:88-94. https://doi:10.1515/helm-2017-0053.

García AC, Valenzuela TG, Florencio AJ, Ruiz GI, Moreno VM, Hernández MB, López BJ, Bravo PD, Pineda RJ, Quezada SA and Avila QG. 2018. Organisms associated with damage to post-harvest potato tubers. Mexican Journal of Phytopathology 36 (2): 308-320. https://doi:10.18781/R.MEX.FIT.1801-1.

GBIF. 2021. (Global biodiversity information facility). Disponible en:https://www.gbif.org/es/ (Consultado en junio 2021).

Gherbawy Y, Hussein MA, Runge F and Spring O. 2018. Molecular characterization of *Alternaria alternata* population isolated from upper Egyptian tomato fruits. Journal of Phytopathology Vol. 166 (10) 1-13. https://doi:10.1111/jph.12752.

Gilardi G, Colla P, Pugliese M, Baudino M, Lodovica GM and Garibaldi A. 2013. Control of *Colletotrichum coccodes* on tomato by grafting and soil amendments. Journal of Phytopathology 162 (2), 116-123. https://doi.org/10.1111/jph.12162.

Guillen SA, Cadenas VCI, Alia TI, López MV, Andrade RM and Juárez LP. 2017. Inhibition colonial *in vitro* from an isolathe of *Colletotrichum acutatum* simmonds to fungicide treatments. Centro agrícola 44:4,11-16

Hafizah AN, Zainal AZA and Chia PI. 2017. Study of Cucumber mosaic virus gene expression in *Capsicum annuum.* Science Heritage Journal 1: (2), 29-31. https://doi.org/10.26480/gws.02.2017.29.31.

Hanssen IM and Lapidot M. 2012. Chapter 2 major tomato viruses in the mediterranean basin 31-66. https://doi:10.1016/b978-0-12-394314-9.00002-6.

Heno FS, Strickland D, Maloney E, Hoepting C and Pethybridge SJ. 2016. Anthracnose of onion caused by *Colletotrichum coccodes* in New York. Plant Disease 100 (10), 2171. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0607-PDN.

Hernández AN, Bautista S, Velázquez MG y Hernández A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Revista Mexicana de Fitopatología. 25 (1): 66-74. http:/www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a9.pdf.

Hide GA, Boorer KJ and Hall SH. 1994. Control de las enfermedades causadas por las imperfecciones del tubérculo de papa en el cv. Estima con métodos químicos y no químicos. Annals of Applied Biology 124. 253-265.

Hirota T, Natsuaki T, Murai T, Nishigawa H, Niibori K, Goto K, Hartono S, Suastika G and Okuda S. 2010. Yellowing disease of tomato caused by tomato chlorosis virus newly recognized in Japan. J Gen Plant Pathol 76, 168-171. https://doi.org/10.1007/s10327-010-0219-4.

Hodson APR and Brown AE. 1993. Ribosomal and mitocondrial DNA polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. Mycol. Res 97: 329-335. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81130-1.

Hussain F and Abid M. 2011. Pests and diseases of chilli crop in Pakistan: a review. Int. J.Biol. Biotech 8 (2): 325-332.

Hussain F, Shaukat SS, Abid M, Usman F and Arbar M. 2013. Control of *Meloidogyne javanica* and *Fusarium solani* in chilli (*Capsicum annuum* L.) with the application of chitin. Pakistan Journal of Nematology 31(2), 165-170.

Hwang ES, OH EJ, Kim D and Oh CS. 2017. Multiple plasmid-borne virulence genes of *Clavibacter michiganensis* ssp. *Capsici* critical for disease development in pepper. New Phytologist Trust Vol. 217 (3), 1177-1189. https://doi:10.1111/nph.14896.

Jamiolkowska A, Skwaeylo BB and Patkowska E. 2018. Morphological identity and population structure of hemibiotrophic fungus *Colletotrichum coccodes* colonizing pepper plants. Acta Scientiarum. Polonorum Hortorum Cultus 17 (4), 181-192. https://doi: 024326/asphc.2018.4.16.

Jellis GJ and Taylor GS. 1974. The relative importance of silver scurf and black dot: two disfiguring diaseases of potato tubers. ADAS Quarterly Review 14, 97-112.

Jimenez CJA y Oseas EUA. 2017. Producción orgánica de tomate saladet (*Solanum lycopersicum*) mediante la inoculación de bacterias. Revista de Energía Química y Fisica 4 (10): 19-25.

Johnny L, Yusuf UK and Nulit R. 2011. Antifungal activity of selected plant leaves crude extracts against a pepper anthracnose fungus, *Colletotrichum capsici* (Sydow) butler and bisby (Ascomycota: Phyllachorales). Afr. J. Biotechnol 10, 4157-4165. https://doi:10.5897/AJB10.2085.

Johnson DA, Douhan LI and Geary B. 2002. Report of *Colletotrichum coccodes* associated with mentha. Plant Disease 86 (6), 695. https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.695B.

Joshi J, Khazanov N Senderowitz H, Burdman S, Lipsky A and Yedidial. 2016. Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in *pectobacteria* and reduce their virulence by potential binding to Expl and ExpR proteins. Sci Rep 6, 38126. https://doi:10.1038/srep38126.

Kelley WT, Boyhan GE, Harrison KA, Granberry DM, Langston DB, Sparks AN and Fonsah EG. 2009. Commercial pepper production Handbook. University of Georgia. pp. 56.

Ki Kim. 1998. Induction of ca2+ calmodium signal by hard-surface contacprimer *Colletotrichum gloesporoides* conidia to germinate and appressoria. Journal of Bacteriology p.5144-5150.

Kidane E, Seid A y Kebede M. 2019. Reaccion de cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum*) hacia nematodos de nudo de raíz (*Meloidogyne incognita*) y marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) Nematropica 49:246-253.

Kim SH, Yoon JB and Park HG. 2008. Inheritance of anthracnose resistance in a new genetic resource, *Capsicum baccatum* PI594137. J. Crop. Biotech 11, 13-16.

Kizheva y, Vancheva ET, Hristova P, Bogatzavska N y Moncheva P. 2020. First report of *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato in Bulgaria 73 (1). https://doi:10.7546/CRABS.2020.01.06.

Kreuze JF, Souza DJAC, Jeevalatha A, Figueira AR, Valkonen JPT and Jones RAC. 2020. Viral diseases in potato. The potato crop 389-430. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_11.

Kumar CD, Un NS, Saleem DM, Ahmad KK. 2018. *Ralstonia solanacearum*: a wide spread and global bacterial plant wilt pathogen. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7 (2): 85-90.

Kurt S, Uysal A, Kara M, Soylu S and Soylu EM. 2017. Natural infection of potato by *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot disease in Turkey. Australasian Plant Dis 12,39. https://doi:10.1007/s13314-017-0266-1.

Landero VN, Lara VFM, Andrade HP, Aguilar PLA y Aguado RGJ. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7 (5):1189-1198.

Lax P, Rondan DJ, Ramos D, Edmundo DM, Braga R and Romulo K. 2015. Host suitability of peppers to the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Crop Protection 79,15-19. https://doi:10.1016/j.cropro.2015.09.024.

Lees AK and Hilton AJ. 2003. Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. Plant Pathol 52:3-12. https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00793 .x.

Lees AK, Brierley JL, Stewar JA, Hilton JA, Wale JS, Gladders P, Bradshaw JN and Peters JC. 2010. Relative importance of seed-tuber and soilborne inoculum in causing black dot disease of potato. Plant Pathology 59, 693-702. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02284.x.

Lima FS, Mattos VS, Silva ES, Carvalho MA, Teixeira RA, Silva JC and Correa VR. 2018. Nematodes affecting potato and sustainable for their management. Edited by Mustafa Yildiz 106-122. https://doi: 10.5772/intechopen.73056.

Long J. 1995. De tomates y jitomates en el siglo XVI. Estudios de Cultura Nahuatl 25, 239-252.

Marais L.1990. Efficacy of fungicides against *Colletotrichum coccodes* on potato tubers. Potato Research 33: 275-281.

Masel A, Braitheaitw K and Irwin J. 1990. Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloesporioides*. Curr Genet 18, 81-86. https://doi.org/10.1007/BF00321120.

Massana CJ, Schnee S, Marie AP, Rutz A, Boccard J, Michellod, Cleroux M, Schurch S, Gindro K, and Luc WJ. 2020. Insights on the structural and metabolic resistance of potato (*Solanum tuberosum*) Cultivars to tuber black dot (*Colletotrichum coccodes*). Frontier in Plant Science 11, 1287. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01287.

Mayanglambam B, Biswal G and Pattanay S. 2020. *In vitro* evaluation of different plant oils on growth of *Ralstonia solanacearum* causing wilt disease in *Capsicum annuum*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 9 (5): 312-315.

Mikulic PM, Schmitzer V, Jakopic J, Cunja V, Veberic R, Munda A and Stampar F. 2013. Phenolic compounds as defence response of pepper fruits to *Colletotrichum coccodes.* 84, 138-145. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2013.09.003.

Mills P, Sreenivasaprasad S and Brown A. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. Microbiology Letters 98, 137-144.

Mmbaga MT and Gurung MA. 2018. Screening of plan endophytes as biological control agents against root rot phathogens of pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal Plant Pathology and Microbiology 9 (3), 2-8.

Mohan SK, Davis JR, Sorensen LH and Schneider AT. 1992. Infection of aerial parts of potato plants by *Colletotrichum coccodes* and its effects on premature vine death and yield. American Potato Journal 69, 547-559. https://doi.org/10.1007/BF02852127.

Moriones E and Castillo JN. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. Science Direct 71 (1), 123-134. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00193-3.

Nandi M, Macdonald J, Liu P, Weselowski B and Yuan Z. 2018. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato molecular interactions and disease management. Molecular Plant Pathology Vol. 19 (8) 2036-2050. https://doi: 10.1111/mpp.12678.

Nechwatal J and Theil S. 2020. Firs reports of *Xanthomonas euvesicatoria* bacterial spot on pepper (*Capsicum annuum*) in Germany. Plant disease p.1-3. https://doi:10.1094/PDIS-02-20-0252-PDN.

Ngullie M, Daiho L and Upadhyay DN. 2010. Biological management of fruit rot in the world's hottest chilli (*Capsicum chinense* jacq.). J. Plan. Prot. Res 50, 269-273. https://doi: 10.2478/v10045010-0047-8.

Nieto AD, Almaraz SA, Ayala EV, Orozco SM y Lara VF. 2019. Primer reporte de *Colletotrichum coccodes* en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en México. Rev.Fitotec. Mex Vol.42 (3):195-200

Nitzan N, Tom F, Cummings and Dennis A. 2008. Diasease potential of soil-and tuberborne inocula of *Colletotrichum coccodes* and black dot severity on potato. Plan Pathology 92: (11) 1497-1502. https://doi.org/10.1094/PDIS-92-11-1497

Overman AJ. 1999. Diseases caused by nematodes. In Jones, JB Jones, JP Stall, RE Zitter, TA. (eds). Compendium of tomato diseases 2 ed. The American Phytopathological Society Press St. Paul, MN p. 49-52.

Pacajes G, Franco J, Esprella R and Main G. 2002. The effect of different crops and cultural practices on multiplication of the potato cyst nematode (*Globodera* spp.) in Bolivia. 13 52-65.

Pasche JS, Taylor RJ and Gudmestad NC. 2010. Colonization of potato by *Colletotrichum coccodes*: effect of soil infestation and seed tuber and foliar inoculation. Plant Disease 94, 905-914. https://doi.org/10.1094/PDIS-94-7-0905.

Paiko AS, Bello LY, Salaudeen MT and Wada AC. 2019. Abundance of plant-parasitic nematodes from rhizosphere of pepper plants as influenced by soil physical and chemical properties in parts of Niger state Nigeria. Journal of Agricultural and Rural Research 4 (1): 31-41. Link: http://aiipub.com/journals/jarr-191019-010080/.

Peralta IE, Knapp S and Spooner DM. 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. Report of the Tomato Genetics Cooperative 56: 6-12.

Pérez MJ, Cota RD, Rodríguez PE, García LE, Beltrán PH, Bernardi LN and Tovar PJ. 2019. First confirmed report of *Colletotrichum coccodes* causing black dot on potato in México. Journal of Plant Diaseases and Protection 127, 269-273. https://doi.org/10.1007/s41348-019-00291-z.

Perfect ES, Hughes BH, Connell JR and Green RJ. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studes on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Genetics and Biology 27:186-198. https://doi.10.1006/fgbi.1999.1143.

Peters JC, Harper G, Brierley JL, Lees AK, Wale SJ, Hilton AJ, Gladders P, Boonham N and Cunnington AC. 2016. The effect of post-harvest storage conditions on the development of black dot (*Colletotrichum coccodes*) on potato in crops grown for different durations. Plant Pathology 65:9, 1484-1491. https://doi.org/10.1111/ppa.12535.

Phillip W y William K. 2008. Enfermedad de la papa en Michigan: punto negro. Departamento de fitopatología, Universidad estatal de Michigan (Consultado en agosto de 2021).

Prasad A, Prasad M, Sharma N, Hari GG and Muthamilarasan M. 2020. *Tomato yellow leaf curl virus*: impact, challenges, and management 25: (9), 897-911. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.015.

Prasad MR, Sagar BV, Devi GU and Rao SR. 2017. *In vitro* Evaluation of fungicides and biocontrol a gents against damping off disease caused by *Sclerotium rolfsii* on tomato. Int. J. Pure. App. Biosci 5 (4): 1247-1257. https://doi:10.18782/2320-7051.5144.

Qing X, Bert W, Gamliel A, Bucki P, Duvrinin S, Alon T and Braun MS. 2018. Phylogeography and molecular species delimitation of *Pratylenchus capsici* n. sp., a new root-lesión nematode in Israel on pepper (*Capsicum annuum*). Phytopathology p 1-35. https://doi:10.1094/phyto-09-18-0324-r.

Read BPJ and Hide A. 1995. Effects bof fungicides on the growth and conidial germination of *Colletotrichum coccodes* and on the development of black dot disease of potatoes. Ann. Appl. Biol 126: 437-447.

Riccioni L, Conca G and Hartman GL. 1998. Firs report of *Colletotrichum coccodes* on soybean in the United States. Plants Diseases 82 (8), 959. https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.8.959C.

Rivadeneira J, Bolaños HA, Alvear WC, Ramirez MG y Subia XC. 2020. Respuesta de UCE-Premium y UCE Allipacha al ataque de *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y *Pectobacterium* sp. Revista Latino Americana de la Papa 24 (1): 13-30. https://doi:10.37066/ralap.v24i1.387.

Rojo BI, Álvarez RB, García RS, Leon J, Sañudo A and Allende R. 2017. Current status of *Colletotrichum* spp. In México: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control. Revista Mexicana de Fitopatología 35 (3): 549-570. https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1703-9.

Sagcan H and Turgut K N. 2019. Detection of potato ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. SCiRep 9 20393. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56680-9.

Sahair RA, Sneha S, Raghu N, Gopenath TS, Karthikeyan GM, Chandrashekrappa GK and Basalingappa KM. 2018. *Solanum tuberosum* L: Botanical, Phytochemical, International

Salem NM, Cao MJ, Odeh S, Turina M and Tahzima R. 2019. First report of *Tobacco mild green mosaic virus* and *Tomato brown rugose fruit virus infecting Capsicum annuum* in Jordan. Plant Disease PDIS-06-19-1189-PDN. https://doi.org/10.94/PDIS-06-19-1189-PDN.

Sasser JN and Freckman DW. 1987. A word perspective on nematology. In Dickson W, Veech J. (eds) Journal on nematology. Hyattsville, MD, USA. P. 7-14.

Sasser JN. 1989. Plant-parasitic nematodes: the farmer´s hidden enemy. Department of Plant Pathology and consortium of International Crop Protection, North Carolina State University. Releigh. USA. P 115.

Sheu ZM, Chiu MH, Chang RJ and Kenyon L. 2020. First report of *Colletotrichum coccodes* causing fruit anthracnose and leaf spot on sweet pepper in Taiwan. New Disease Reports 42 (9) http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.042.009.

Shurtleff MC and Averre III CW. 2000. Diagnosing plant diseases caused by nematodes. The American Phytophatological Society. St. Paul, Minnesota, USA. P 187.

Sautua FJ, Baron C, Pérez HO and Carmona MA. 2019. First report of resistance to carbendazim and procymidone in *Botrytis cinerea* from strawberry, blueberry and tomato in Argentina. Protección de cultivos 125, 104879. https://doi:10.1016/j.cropro.2019.104879.

Saxena A, Raghuwanshi R, Gupta VK. and Singh HB. 2016. Chilli Anthracnose: the epidemiology and management. Frontiers in Microbiology 71527. https://doi:10.3389/fmicb.2016.01527.

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentario. 2019. Protocolo de Diagnosis: *Colletotrichum coccodes* (Antracnosis del tomate y chile) versión 2.0. Tecámac, México.

Sholberg PL, Walker MC, Gorman DTO and Jesperson GD. 2007. First report of *Phytophthora capsici* on cucurbits and peppers in British Columbia. Canadian Journal of Plant Pathology 29 (2), 153-158. https://doi.org/10.1080/0760660709507451.

SIAP (Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera). 2020. Disponible en: http//infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do (Consultado en julio 2021).

Solanum lycopersicum L. GBIF Secretariat. 2021. GBIF backbone taxonomy checklist dataset. https://doi.org/10.15468/39omei

Solanum tuberosum L. GBIF Secretariat. 2021. GBIF backbone taxonomy checklist dataset. Doi.org/10.15468/39omei

Sharma PN, Katoch P, Sharma SK and Sharma OP. 2011. First report on association of *Colletotrichum coccodes* with chili anthracnose in India. Plant Pathology 95: (12) 1584-1584. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0270.

Stefanczyk E, Sobkowiak S, Brylinska M and Sliwka J. 2016. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. European Journal of Plant Pathology 145,871-884. https://doi: 10.1007/s10658-016-0875-0.

Strand LL. 2008. Integrated Pest Management for Strawberries. 2nd ed. University of California Oakland.

Templeton MD, Rikkerink EHA, Solon SL and Crowhurst RN. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. Gene 122:225-230. https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90055-t.

Than PP, Jeewon R, Hyde KD, Pongsupasamit S, Mongkolporn O and Taylor PWJ. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. Plant Pathol 57, 562-572. https://doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01782.x.

Tm P, Pranathi A, Sai AK, Chittaragi NB and Koolagudi SG. 2018. Tomato leaf disease detection using convulutional neuronal networks. Eleventh International Coference on Contemporary Cumputing (IC3). https://doi:10.1109/ic3.2018.8530532.

Tozze JH, Gioria R, Suzuki O, Regiane BK, Souza BR and Mssola JNS. 2006. Natural ocurrence of *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughe caising anthracnose on pepper (*Capsicum annuum* L.) in Brazil. Summa Phytopathol 33: (4), 419.

Tsror L, Erlich O and Hazanovsky M. 1999. Effect of *Colletotrichum coccodes* on potato yield tuber quality and stem colonization during spring and autumn. Plant Disease 83, 561-565.

Turkolmez S, Dervis S, Ciftci O, Ulubas SC and Dikilitas M. 2019. New disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* devastates tomatoes (*Solanum lycopersicum*) in Turkey. Crop Protection 118, 21-30. https://doi:10.1016/j.cropro.2018.12.004.

Tyvaert L, Everaert E, Lippens L, Cuijpers WJM, Franca SC and Hofte M. 2019. Interaction of *Colletotrichum coccodes* and *Verticillium dahliae* in pepper plants. European Journal of Plant Pathology 155, 1303-1317. https://doi.org/10.1007/s10658-019-01857-1.

Udayanga D, Manamgoda DS, Liu X, Chekeatirote E and Hyde KD. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? Fungal Diversity 61:165-179. https://doi.org/10.1007/s13225-013-0257-2.

Uribe E and Loria R. 1994. Response of *Colletotrichum coccodes* to fungicides *in vitro*. American Potato Journal 71, 455-465. https://doi.org/10.1007/BF02849099.

Villar LE, Gomez RO, Rojas MR and Zavaleta ME. 2016. Presence of *Meloidogyne enterolobii* on jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sinaloa, México. Helminthologia 53 (2) 155-160. https://doi/10.1515/helmin-2016-0001.

Vincent JM.1947. Distoration of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. Nature 159:850.

Vrisman CM, Testen AL, Elahi F and Miller SA. 2016. First report of tomato brown root rot complex caused by *Colletotrichum coccodes* and *Pyrenochaeta lycopersici* in Ohio. Plant disease 101 (1), 127. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0623-PDN.

Waller JM. 1992. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops, "in *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control, eds J. A. Bailey and M. J. Jeger (Wallingford: CAB International), 167.186.

Wang Z, Ma LY, Cao j, Li YL, Ding LN, Zhu KM, Yang YH and Tan XL. 2019. Recent advances in mechanisms of plan defense to *Sclerotinia sclerotiorum*. Front. Plant SCI. 10:1314. https://doi/10.3389/fpls.2019.01314

White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR pro-tocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp 315-322.

Woodhall JW, Lees AK, Edwards SG and Jenkinson P. 2007. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. Plant Pathology 56 (2), 286-295. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01545.x.

Zhang D, Yu S, Yang Y, Zhang J, Zhao D, Pan Y, Fan Z and Zhu J. 2020. Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato. Front. Microbiol 11:1196. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196.

Zhang F, Wang Y. Zhan X. Dai D, Guo G, Guo S, Soly M and Zhang J. 2019. First report of *Rotylenchulus reniformis* on tomato in Henan, China. Plant Disease p:1-5. https://doi/10.1094/PDIS-09-18-1633-PDN.