

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y GENÉTICA DEL AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum gloeosporioides*) EN GUANÁBANA (*Annona muricata*) EN EL VALLE DEL CAUCA

Elizabeth Álvarez, César Andrés Ospina, Juan Fernando Mejía y Germán A. Llano

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Correspondencia: e.alvarez@cgiar.org

RESUMEN

La Antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, ocasiona pérdidas hasta del 90% en huertos no tecnificados de guanábana. Para el control de la enfermedad se requiere conocer bien la sintomatología y las características del agente causal. Teniendo en cuenta que existe poca información al respecto, en este estudio se pretendió identificar y caracterizar morfológica, genética y patogénicamente los aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de cultivos de guanábana en el Valle del Cauca (Colombia). De 109 aislamientos se caracterizaron 54, seleccionados al azar. La caracterización se basó en morfología de colonia, patogenicidad y reacción en cadena de la polimerasa (RCP) usando cebadores específicos ITS, *CaInt2* (*C. acutatum*) y *CgInt* (*C. gloeosporioides*). Además se realizó corte con enzimas de restricción de la región ITS y se evaluó la diversidad genética de la población mediante Amplificación al Azar de Microsatélites (RAMs). Los resultados mostraron correlación de -0,84 entre características de crecimiento de los aislamientos con su patogenicidad, destacándose como muy patogénicos los de crecimiento lento que presentaron micelio gris, esporulación escasa y relieve ondulado. La amplificación con los cebadores específicos para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, generó fragmentos de 450 pb y 490 pb respectivamente, corroborando la presencia de dos especies. Por otra parte la combinación de cebadores universales ITS1 e ITS4 generó un fragmento de 580 pb, que al digerirlo con las enzimas de restricción *Hae* III y *Rsa*I, mostró diferencias en los patrones de restricción, dando lugar a dos grupos, correspondientes a las dos especies de *Colletotrichum* spp. El análisis de RAMs, mostró una gran variabilidad genética de los aislamientos y permitió concluir que hay correlación entre variabilidad patogénica - diámetro de colonia, con variabilidad genética. Estos resultados evidencian la diversidad fenotípica y genética de *Colletotrichum* spp. asociado a la antracnosis en guanábana.

Palabras clave: Frutales, enfermedades, hongos

SUMMARY

Anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, generates losses of up to 90% in traditionally grown soursop orchards. The pathogen attacks the leaves, branches, flowers, and fruits, producing black fruit rot, especially during the rainy season. Typical disease symptoms initially observed includes small dark specks in the tissue, followed by the formation of slightly sunken spots surrounded by a dark halo. Of 109 isolates of *Colletotrichum* spp. obtained from diseased crops in several production areas of Valle del Cauca, 54 were selected at random and characterized based on colony morphology, pathogenicity and polymerase chain reaction (PCR), using the specific primers ITS *Ca Int2* (*C. acutatum*) and *CgInt* (*C. gloeosporioides*). In addition restriction enzyme digestion was performed on DNA from the internally transcribed spacer region of the ribosomal RNA gene for each strain and the genetic diversity of this population was evaluated by random amplified microsatellites (RAMs). The results showed a correlation of -0.84 between growth characteristics of isolates and pathogenicity. Slow growing isolates presenting gray mycelium, limited sporulation, and undulating relief were found to be highly pathogenic. The amplification with specific primers for *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* generated 450-bp and 490-bp fragments, respectively, confirming the species identity. Fifty isolates were identified as *C. gloeosporioides* and 4 as *C. acutatum*. The combination of universal primers ITS1 and ITS4 generated a 580-bp fragment, which was digested by the *Hae* III and *Rsa* I restriction enzymes. The differences in restriction patterns gave rise to two groups that corresponded to each of the pathogen species. The analysis of RAMs indicated high genetic variability among isolates and made it possible to detect a relationship among pathogenic variability - colony diameter with genetic variability. These results illustrate the phenotypic and genetic diversity of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose of soursop.

Keywords: fruits, diseases, fungi

INTRODUCCIÓN

Los frutales tropicales se perfilan como una de las mejores opciones en la agricultura Colombiana por el crecimiento de la demanda nacional e internacional que se ha reportado en 3,75% anual en los últimos cuatro años y por la activación de la industria poscosecha (jugos, mermeladas etc.), cuya demanda es suplida en la actualidad por importaciones (Cabra *et al*, 2002). La guanábana es una de las frutas que se presenta como promisoría para el consumo fresco y para la industria, con grandes posibilidades en los mercados nacionales y extranjeros por sus características organolépticas (García, 2001). El cultivo de la guanábana presenta una alta generación

de empleo (250 jornales/hectárea/año), superando a cultivos como la palma de aceite, caña de azúcar, arroz entre otros (Urpa, Valle del Cauca, 2000). Además es altamente rentable con rendimientos cercanos a los 2500 US\$/hectárea-año en cultivos tecnificados (Cabra *et al*, 2002). Sin embargo, por ser Colombia el centro de origen de la guanábana, se presenta una serie de problemas causados por fitopatógenos que han coevolucionado con la planta, destacándose *Colletotrichum gloeosporioides* el cual ocasiona la antracnosis, cuya problemática se agrava por la expansión de cultivos en zonas agroecológicas favorables a la enfermedad, constituyéndose en uno de los principales limitantes en la producción de guanábana en Colombia (Guz-

mán, 1980; Zaráte, 1881; Zaráte, 1987; Zaráte, 1988). La incidencia de la enfermedad se incrementa debido a factores como la selección inadecuada de zonas agroecológicas, distancias de siembra, drenaje, podas, fertilización, deficiente recolección de frutos afectados e inadecuado uso de fungicidas. Para el control de la enfermedad se requiere conocer bien la sintomatología y las características del agente causal. Teniendo en cuenta que existen pocos estudios al respecto, en esta investigación se pretendió identificar y caracterizar morfológica, genética y patogénicamente los aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de cultivos de guanábana en el Valle del Cauca (Colombia).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de muestras

Se obtuvieron muestras de hojas, ramas y flores de árboles de guanábana con síntomas característicos de Antracnosis (Figura 1). El muestreo se realizó en fincas con diferentes niveles de incidencia de la enfermedad ubicadas en zonas productoras del Valle del Cauca (Tabla 1).

Tabla 1. Fincas del departamento del Valle del Cauca en donde se determinó la presencia de árboles de guanábana afectados por antracnosis.

Finca	Municipio	Observaciones	Aislam No.
Lote exp. BIOTEC, CIAT	Palmira	Algunos árboles con afección en el follaje	11
Lote Corpoica Reg. 5	Palmira	Alta incidencia, afección en follaje y ramas	12
Agrícola Varaonda	Pradera	Algunos árboles con follaje, ramas y flores afectadas	34
Bitaco	Bitaco	Algunos árboles con lesiones en pedúnculo	1
La Elena	Montenegro	Algunos árboles con lesiones en hojas	1
La Marcela	Sevilla	Algunos árboles con lesiones en el follaje	4
Venecia 3	Caicedonia	Alta incidencia, lesiones en hojas, rama y pedúnculo	30
San Rafael	La Unión	Algunos árboles con lesiones en follaje y ramas	13
Brasil ¹	Anserma Nuevo	Algunos árboles con lesiones en el follaje.	3

¹ El lote se había asperjado con fungicida cúprico

Aislamiento del patógeno

Las muestras se cortaron en fragmentos de tejido sano y enfermo, se lavaron con agua durante 1h, etanol al 70% por 45 seg. y finalmente agua durante 1 min. Los aislamientos se obtuvieron por siembra directa en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) siguiendo el procedimiento descrito por Agostini y Timmer, (1992) y por Ospina, (2002).

Para obtener cultivos monospóricos se sembró una asada de esporas del aislamiento puro, por agotamiento en cajas de petri con agar-dextrosa (Agar 15 gr y dextrosa 20 gr /L), incubando por 24 horas a 27°C en oscuridad. Los aislamientos se observaron al estereoscopio ubicando esporas individuales germinadas, se marcó el sitio con un micro gancho sobre el agar y luego se verificó en el microscopio la presencia de una sola espora. Se transfirió un fragmento de agar con la espora seleccionada a una nueva caja de petri con PDA + estreptomycin-300 mg/L (PDA+S.), colocándolo sobre papel filtro estéril Whatman® # 1, utilizando el micro gancho y teniendo la precaución de que la espora quedara en contacto con el nuevo medio. Los aislamientos se incubaron de 7 a 10 días a 27°C (Ospina, 2002; Agostini y Timmer, 1992).

Los aislamientos se mantuvieron en cajas de Petri con medio PDA y se transfirieron a medio fresco aproximadamente cada tres semanas. (González *et al*, 1998). Para su conservación a largo plazo, los aislamientos monospóricos se transfirieron a papel filtro siguiendo la metodología de Aricapa y Correa, 1994.

Caracterización morfológica

Se seleccionaron 54 aislamientos obtenidos en diferentes regiones productoras del Valle del Cauca y 2 controles (yuca y cítricos) (Tabla 1), se sembraron en medio PDA + S (Agostini y Timmer, 1992a) y se incubaron a 29°C por 78 horas. Se evaluaron cuatro repeticiones por aislamiento y las variables consideradas fueron: diámetro y color de la colonia.

Pruebas de patogenicidad

Antes de proceder a realizar las pruebas de patogenicidad cada aislamiento se sembró en tres cajas de petri con medio de cultivo PDA + S y 2 cajas con Agar Avena (AV) + 300 mg de estreptomycin/L, esparciendo una asada de esporas de un cultivo monospórico puro sobre la superficie del medio y se incubaron durante 15 días a 25°C, con periodo alterno de luz y oscuridad. Posteriormente se preparó una suspensión de esporas agregando agua estéril directamente sobre la colonia en la caja petri para resuspender las masas de esporas. La suspensión inicial se recolectó en un tubo Falcon® de 50mL filtrándola con gasa para eliminar micelio y fragmentos de medio, luego se llevó a una concentración de 1×10^7 esporas/mL y se le agregó Inex®, como dispersante de esporas a una concentración final de 0,5%.

Para la inoculación bajo condiciones de invernadero se seleccionaron árboles injertos de tres meses de edad, de una copa de guanábana cultivar Elita sobre un patrón de semilla sexual de guanábana autóctona de la región (producidos por Profrutales S. A.). Previo a la inoculación, los árboles se asperjaron con Carborundum® (polvo abrasivo), utilizando un aspersor Devilbiss.

La inoculación de los árboles se realizó por el método de herida, realizando pequeños cortes en bisel al tallo, y por aspersión al tallo, el ápice y hojas más jóvenes con una suspensión de esporas, a una concentración de 1×10^7 esporas/mL. Los controles se asperjaron con agua destilada estéril y se colocaron fragmentos de medio PDA en los cortes en bisel realizados al tallo.

Se inocularon 54 aislamientos de guanábana, 1 aislamiento de yuca, 1 de cítricos y 3 controles con agua, en un diseño experi-

mental completamente al azar con 3 repeticiones. Las plantas permanecieron 13 días en invernadero, antes de la inoculación, permitiendo su adaptación a las nuevas condiciones y el fortalecimiento de los injertos.

Las plantas inoculadas se ubicaron al azar en cámara húmeda durante 72 horas, humedad relativa del 100% y una temperatura de 27°C. Posteriormente las plantas se mantuvieron a 29°C y recibieron humidificaciones periódicas de 5 minutos cada hora durante 13 días y luego un minuto, cada 3 horas hasta finalizar el ensayo (1 mes).

Para la evaluación de la reacción de las plantas a la inoculación se utilizó una escala de severidad con base en la aparición de lesiones sobre el tallo, considerado por los agricultores como el síntoma más importante y que mayor daño causa a los árboles (Tabla 2).

Tabla 2. Escala de severidad para evaluar la antracnosis en guanábana

Grado	Descripción de síntomas
0	Ausencia total de lesiones en tallo
1	Por lo menos una lesión en el tallo
2	Varias lesiones pequeñas a lo largo del tallo
3	Varias lesiones pequeñas y medianas a lo largo del tallo
4	Lesiones pequeñas, medianas y grandes a lo largo del tallo
5	Total deterioro de la planta, las lesiones coalescen de forma que no se diferencia fácilmente el tamaño de las mismas

Las evaluaciones se realizaron a los 3, 13 y 30 días después de la inoculación. La información obtenida en este ensayo se analizó estadísticamente con el programa SAS. Se calculó para cada aislamiento, el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) durante el experimento, se hizo un análisis de varianza y se determinó la correlación de las variables calculadas.

Identificación de las especies y caracterización genética

Para identificar las especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en guanábana y determinar su variabilidad genética se utilizaron técnicas moleculares que incluyeron la amplificación de la región del espaciador interno transcrito, ITS ("Internal Transcribed Spacer" por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal (ADNr), una de las regiones más ampliamente utilizada en hongos incluyendo cebadores específicos para su sistemática molecular a nivel de especie y aún entre especies para identificación de razas (Álvarez *et al*, 2001; Freeman *et al*, 2000; Freeman *et al* 1996; Freeman *et al*, 1998; Sreenivasaprasad *et al*, 1996). También se utilizó el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción combinado con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) para detectar diferencias inter específicas (Freeman *et al*,

2000) y la amplificación aleatoria de micro-satélites (RAMs, Random Amplification of microsatellites, por sus siglas en Inglés) (Hantula *et al*, 1996) para identificar variabilidad entre aislamientos de la misma especie.

Multiplicación de los aislamientos y obtención de ADN. Los 56 aislamientos del estudio se sembraron en medio de Papa-Dextrosa líquido (infusión de 200gr de papa, 20gr de dextrosa/L) y se incubaron durante 15 días a 25°C con períodos alternos de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad. Después de la incubación se colectó el micelio y se filtró en papel filtro estéril, se depositó en cajas de Petri estériles y se secó a 35°C durante tres días; posteriormente se maceró con nitrógeno líquido y se depositó en tubos Eppendorf de 1,5 mL, utilizando 0,3 g de micelio seco macerado por tubo para iniciar la extracción del ADN. En este caso, se siguió el protocolo descrito por George Mahuku (Mahuku, 2004), con algunas modificaciones. Se adicionaron 900µL de buffer de extracción (NaCl 1,4 M, 20 mM EDTA, 100 mM Tris – HCl pH 8,0) y 1,5 µL de proteinasa K 10mg/mL, a 0,3g de micelio seco macerado mezclándolos en un agitador tipo vórtex. Los tubos se llevaron a incubación a 65°C por una hora, se adicionaron 200 µL de acetato de amonio 7,5M, manteniéndolos a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 12500 r.p.m. por 20 min, transfiriendo el sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 1,5 mL, al cual se le adicionó igual volumen de Cloroformo – Isoamil (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 12500 r.p.m., durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante. Este se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, y se le adicionó 1/3 del volumen de isopropanol frío, y se conservó a -20°C durante la noche. Posteriormente se centrifugó a 12500 r.p.m, 10 min y se descartó el sobrenadante. El centrifugado se lavó, adicionando 350 µL de etanol 70 % frío; luego se centrifugó por cinco minutos a 12000 r.p.m.; este lavado se hizo dos veces, se descartó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado para eliminar el exceso de alcohol, y se resuspendió en 50 µL de Buffer TE.

Amplificación de la región ITS. Para la amplificación de la región ITS, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores universales de la región conservada del gen ADNr descrita por White *et al*, 1990:

ITS 1: (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e
ITS 4: (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'),
ITS 2: (5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3')

Para identificar el patógeno se usaron los cebadores específicos:

CgInt: (5'GGCCTCCGCTCCGGGCGG3') y
CaInt2: (5'GGGGAAGCCTCTCGCGG3'),

combinados con el cebador – ITS 4 de la región conservada del gen 25/28S del ADNr (Brown *et al*, 1996; Afanador *et al*, 2003).

Para cada etapa de PCR se utilizó: Buffer *Taq* 10 X a una concentración final de 1X (100mM de Tris HCl, pH 8, 2,5 mM MgCl₂ y 500 mM KCl) 0,2 mM de cada uno de los dNTPs, 0,5 mM de cada primer, 1,5mM de MgCl₂, 2ng/µL de ADN, agua HPLC filtrada (0,22 µm) - autoclavada y 0,0375 U/µL de *Taq* polimerasa. Las condiciones de amplificación consistieron en 40 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94 °C por 30 seg (120 seg para la inicial), 55 °C por 30 seg de apareamiento y una extensión de 120 seg a 72 °C (240 seg para la final), utilizando un termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, MA).

Análisis PCR-RFLP. Para el análisis con enzimas de restricción se evaluaron ocho enzimas, *Alu I*, *Msp I*, *Dra I*, *Hae III*, *Hind III*, *Rsa I*, *Taq I* y *EcoRV*. Para la reacción de digestión se tomaron 10 µL del producto amplificado por PCR con los cebadores ITS 1 – ITS 4, 2 µL de buffer 10X para la enzima y 0,6 µL de enzima a una concentración de 10000 u/µL. El volumen final de la reacción fue 20µL que se completó con agua HPLC filtrada (0,22 µm) y autoclavada. La reacción de digestión se incubó a la temperatura sugerida para cada enzima.

Inicialmente se analizaron 10 aislamientos con características morfológicas diferentes. Las enzimas de restricción que mostraron polimorfismo en los patrones de corte entre estos aislamientos, se usaron para cortar el producto amplificado de los 46 aislamientos restantes.

Amplificación al azar de microsatélites (RAMs). Para determinar la variabilidad genética de los aislamientos se utilizó la amplificación aleatoria con cebadores micro-satélites RAMs: GT, CA, CGA, CT, CCA, TG, AG. En la reacción de PCR se utilizó: Buffer *Taq* 10X a una concentración final de 1X (100 mM Tris HCl, pH 8; 2,5 mM MgCl₂ y 500 mM de KCl) 0,2 mM de cada uno de los dNTPs, 1mM del cebador, 1,5mM de MgCl₂, 1 ng/µL de ADN, agua HPLC filtrada (0,22 µm) - autoclavada y 0.0375 U/µL de *Taq* polimerasa.

Visualización y análisis de productos. Para la visualización y análisis del producto amplificado de la región ITS se prepararon geles de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio 0,5µg/mL y buffer TBE 0,5X (trisma base, ácido bórico y EDTA). Las condiciones de la electroforesis fueron: 100 voltios, 35 miliamperios. El producto digerido con enzimas de restricción se corrió en geles de agarosa al 0,7 % y Sinergal al 0,5%, a 120 voltios y 65 miliamperios. Los fragmentos amplificados con RAMs se observaron mediante electroforesis

en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio al 1% de una solución de 10mg/mL, a 150 voltios y 80 miliamperios.

Análisis de datos. Cada fragmento generado con RAMs fue analizado como un carácter independiente. Los fragmentos de ADN del mismo tamaño se asumieron como un representante del mismo locus genético y evaluado como ausente o presente. Para cada banda individual se asignó el valor de 1 para presencia y 0 para ausencia. La similitud entre los individuos fue estimada usando el coeficiente de similitud de Dice. El dendrograma se generó usando UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean, por sus siglas en inglés), con el paquete estadístico NTSYS-PC versión 2.02.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del patógeno y caracterización morfológica

Se obtuvieron 109 aislamientos (Tabla 1), de las seis zonas del Valle del Cauca y el Eje Cafetero, los cuales se almacenaron en papel filtro a -20°C, siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos.

En la colección de aislamientos obtenida, se determinaron tres tipos de colonia (Figura 2, Tabla 3). El tipo de colonia 1, se caracterizó por su crecimiento muy lento, micelio gris, esporulación lenta, escasa y con un relieve ondulado. Este tipo de colonia se obtuvo frecuentemente de lesiones en hojas muy jóvenes. El tipo 2 se caracterizó por su esporulación rápida y abundante, de color naranja, con poco micelio de color blanco y crecimiento rápido. La colonia tipo 3, se caracterizó por su crecimiento rápido, micelio blanco-grisáceo, abundante, esponjoso, que al aglomerarse genera una masa micelial oscura y compacta; la esporulación es medianamente abundante y se observan masas de esporas de color anaranjado, muy bien definidas, a manera de gotas. El tipo de colonia 1 se detectó con mayor frecuencia (53,7%) seguido por el tipo 3 (7,4%) y el tipo 2 (38,9%). Las diferencias morfológicas entre los tipos de colonia observados sugieren que por lo menos una de ellas, la tipo 2, puede ser de una especie diferente a las del tipo 1 y 3, situación que sugiere la presencia de dos especies de *Colletotrichum* asociadas a la enfermedad como ocurre en el olivo (Martin y Garcia-Figueroles, 1999), al juzgar por las características de las colonias de los aislamientos (Figura 2).

Pruebas de Patogenicidad

El análisis estadístico de los datos mostró una correlación inversamente proporcional entre patogenicidad y el tipo de colonia (coeficiente de correlación -0,84), de forma que los aislamientos que presentaron tipo de colonia 1 se correlacionaron con alta patogenicidad,

exceptuando los aislamientos m17pdf1-37, 20452 y los controles positivos de yuca y cítricos; los tipos de colonia 2 y 3 mostraron patogenicidad intermedia a baja (Tabla 3).

El avance de la enfermedad, medido en función del área bajo la curva o ABCPE (Tabla 3), realizando el análisis de varianza, mostró diferencias significativas entre aislamientos en cuanto a patogenicidad (Tabla 3 y Tabla 4), y facilitó la conformación, para cada aislamiento, de cinco grupos, por medio del análisis de conglomerados Ward con un nivel de confianza de 97% (Tabla 3). Por su parte con el diámetro de colonia, se formaron cinco grupos mediante el mismo análisis de conglomerados. El 80% de los aislamientos con promedios entre 1,0 y 2,9 cm de diámetro, presentaron alta patogenicidad mientras que el 20% restante con promedios entre 3,0 y 4,2 cm mostraron patogenicidad intermedia y baja. De los 54 aislamientos obtenidos de guanábana, el 5,5% no reprodujo síntomas en las plantas inoculadas, el 9,3% reprodujo síntomas con valores de ABCPE entre 2 y 6, correspondiente a baja patogenicidad, el 61,1% correspondió a patogenicidad intermedia, con valores de ABCPE entre 9,75 y 77, mientras que el 20,4% mostró alta patogenicidad, con valores de ABCPE mayores de 80 (Tabla 3). Los aislamientos más agresivos fueron lentos en su crecimiento en medio de cultivo PDA+S.

Los aislamientos patogénicos, como resultado de las inoculaciones bajo las condiciones experimentales, indujeron la sintomatología característica de la enfermedad, según lo descrito por otros investigadores (Zárate, 1981; Zárate, 1987; Zárate, 1998). En hojas inoculadas se observaron lesiones típicas, con presencia de defoliación, la cual no fue consistente entre repeticiones. Los aislamientos que causaron enfermedad con escala entre 3 y 5, indujeron defoliaciones fuertes o totales. En general se observaron lesiones necróticas de borde oscuro en hojas, sin halo clorótico, ni forma definida, ubicadas principalmente en el ápice de la hoja. Estas lesiones avanzaron hacia el pedúnculo y cubrieron el ancho de la lámina foliar. En el haz y el envés de la hoja se observaron lesiones sobre la nervadura, que ocasionaron su entorchamiento. En flores, se presentaron lesiones deprimidas principalmente sobre los sépalos, oscuras, con forma redondeada y bien definida. La inoculación de tallo reprodujo síntomas similares a los observados en el campo, observándose en tallos y ramas afectadas manchas negras, deprimidas, inicialmente ovaladas o redondeadas, con bordes irregulares. En cortes longitudinales, se apreció un avance necrótico muy oscuro; en lesión avanzada se observó un exudado de aspecto seco sobre la corteza.

Identificación de las especies y caracterización genética

La amplificación de la región ITS del ADN



Figura 1. Síntomas característicos de Antracnosis en guanábana: Izquierda = flores, Centro = hojas y derecha = ramas. Nótese el tipo de lesiones característico.

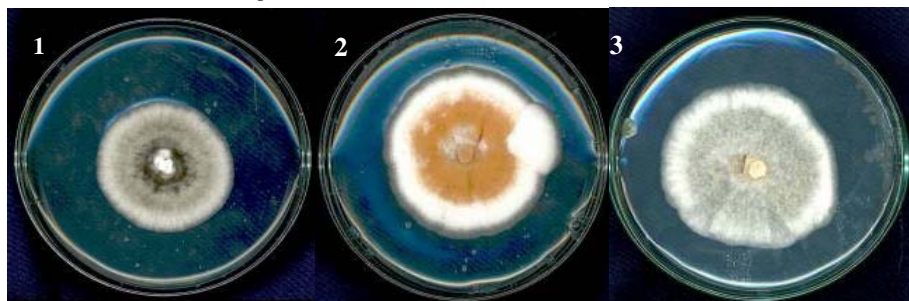


Figura 2. Tipos de colonias de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos en medio de cultivo PDA modificado con streptomicina. 1 = 19942-40, 2 = m3612sr-46, 3 = m25pdrb.

ribosomal (ADNr), con los cebadores ITS 1 e ITS 4 mostró un fragmento de 580 pb, mientras el producto amplificado con los cebadores ITS 1 e ITS 2 tuvo un tamaño de 240 pb. (Figura 3), indicativo de ausencia de polimorfismo entre los aislamientos de *Colletotrichum* spp. evaluados. Al digerir el producto amplificado con las enzimas de restricción *Hae* III y *Rsa* I, se observaron diferencias entre los aislamientos, confirmándose la presencia de dos especies.

La amplificación del ADN ribosomal con cebadores específicos a partir del ADN obtenido de 56 aislamientos de *Colletotrichum* spp., produjo un fragmento de 450 pb en 50 aislamientos con la combinación de cebadores *CgInt* (específico para *C. gloeosporioides*) e ITS 4, igual al fragmento amplificado en el aislamiento control (*C. gloeosporioides* de cítricos) (Figura 4A). En contraste, la reacción de PCR con el cebador específico para *C. acutatum* *CaInt2* y el cebador ITS 4 amplificó un fragmento de 490pb en 5 aislamientos incluyendo el control *C. acutatum* de yuca (Figura 4B). Un aislamiento no amplificó con los cebadores específicos evaluados en este estudio (*CgInt* y *CaInt2*). El 89,3% de los aislamientos evaluados correspondieron a la especie *C. gloeosporioides*, el 8,9% a la especie *C. acutatum* y el 1,7% pertenece, posiblemente, a una especie aún no identificada (Tabla 3). Sin embargo, el análisis genético y los criterios morfológicos colocaron este aislamiento dentro del género *Colletotrichum* sp. En futuros estudios es recomendable realizar análisis de secuencia de la región ITS

(ITS1–5.8S–ITS2), para obtener mayor información sobre las especies de este género asociadas con la antracnosis en guanábana (Afanador *et al*, 2003).

El análisis PCR-RFLP, con la enzima *Msp*I, generó un patrón de bandas monomórfico con fragmentos de 290 y 110 pb. Con la enzima *Alu* I se obtuvieron fragmentos de 280 y 95 pb. Las enzimas *Dra* I y *Hind* III no tuvieron sitio de corte y las enzimas *Hae* III y *Rsa* I mostraron diferencias entre aislamientos, generando dos grupos correspondientes a las dos especies de *Colletotrichum* spp. identificadas. *Hae* III generó fragmentos de 290, 180 y 105 pb para los aislamientos de *C. gloeosporioides* y fragmentos de 290, 180 y 95 pb para *C. acutatum*, *Rsa* I generó un patrón monomórfico con fragmentos de 190 y 380 pb para *C. gloeosporioides* y no presentó corte para los aislamientos de *C. acutatum* (Figura 5).

La amplificación aleatoria de microsatélites (RAMs) con los aislamientos utilizando el cebador CA: 5'DBDACACACACACACA3', generó patrones de bandas que indican el polimorfismo en los aislamientos de *Colletotrichum* spp. (Figura 6) y por lo tanto la presencia de variabilidad genética.

El dendrograma de similitud (Figura 7), basado en el coeficiente de Dice, para 56 aislamientos de *Colletotrichum* spp, generado a partir de la técnica PCR-RFLP, RAMS, amplificando el ADN con el cebador CA y la amplificación con los cebadores específicos *CgInt* y *CaInt2* en combinación con el cebador ITS 4, mostró alta variabilidad genética y

Tabla 3. Origen, grupos morfológicos, genéticos y patogenicidad de 56 aislamientos de *Colletotrichum* spp. del Valle del Cauca, inoculados en el cultivar de guanábana (*Amona muricata*) Elita, en condiciones de invernadero

Identificación	Sitio	Tejido	Diámetro (cm) Promedio ^a	Progreso de la enfermedad ABCPE ^b	Patogenicidad grupo ^c	Diámetro grupo ^d	Tipo de colonia	RAMs grupo	PCR-RFLP grupo	CgInt / ITS 4 ^e	CaInt2 / ITS 4 ^f
19942-40	Corpoica	Hoja	1,8	98,25	5	1	1	1	2	+	-
19945-36	Corpoica	Hoja	2,3	60,63	4	4	1	2	2	+	-
19945-35	Corpoica	Hoja	2,1	63,75	4	1	1	1	2	+	-
19945ped-36	Corpoica	Pedúnculo	2,2	80,00	5	1	1	1	2	+	-
cd12rb-29	Caicedonia	Rama	3,6	nd ^g	nd	3	3	4	1	-	+
cd14r-42	Caicedonia	Rama	3,9	27,33	3	5	3	1	2	+	-
cd23r-44	Caicedonia	Rama	3,0	14,50	2	2	3	4	1	-	+
19945-38	Corpoica	Hoja	2,0	65,88	4	1	1	1	2	+	-
20451-15	Corpoica	Hoja	2,0	69,75	4	1	1	1	2	+	-
Amonmt6h-3	CIAT	Hoja	3,6	11,75	2	3	3	2	2	+	-
Amonvs1ab2m6-4	CIAT	Hoja	3,3	10,75	2	2	3	2	2	+	-
c1-19	CIAT	Hoja	4,0	2,00	1	5	3	2	2	+	-
c5-26	CIAT	Hoja	3,8	2,00	1	5	3	2	2	+	-
cd14h	Caicedonia	Hoja	2,0	88,25	5	1	1	1	2	+	-
cd1h	Caicedonia	Hoja	2,1	87,13	5	1	1	1	2	+	-
20172ped	Corpoica	Pedúnculo	2,1	66,50	4	1	1	1	2	+	-
cd23ra-44	Caicedonia	Rama	4,0	10,00	2	5	3	2	2	+	-
cd40-41	Caicedonia	Rama	3,3	2,00	1	2	3	2	2	+	-
cd43r	Caicedonia	Rama	1,8	94,00	5	1	1	1	2	+	-
cd6r-28	Caicedonia	Rama	3,4	25,25	3	2	3	2	2	+	-
cd7r	Caicedonia	Rama	2,0	71,50	4	1	1	1	2	+	-
m10pdr-49	Pradera	Rama	2,3	31,75	3	4	1	3	2	+	-
f20-12	CIAT	Hoja	3,2	20,5	3	2	3	3	2	+	-
f21-5	CIAT	Hoja	3,8	nd	nd	5	3	3	2	+	-
f28-17	CIAT	Hoja	3,6	2	1	3	3	2	2	+	-
m17pdf-37	Pradera	Flor	2,1	11,67	2	1	1	1	2	+	-
m12sra-9	La Unión	Hoja	3,8	29,88	3	5	3	2	2	+	-
m13pd	Pradera	Hoja	2,1	72,00	4	1	1	1	2	+	-
m13sra-22	La Unión	Hoja	3,7	nd	nd	3	3	2	2	+	-
m13srb-31	La Unión	Hoja	2,4	83,88	5	4	1	3	2	+	-
m14pdh	Pradera	Hoja	2,6	55,75	4	4	1	1	2	+	-
m15pd-47	Pradera	Hoja	2,1	76,13	4	1	1	1	2	+	-
cd12-43	Caicedonia	Hoja	3,9	12,00	2	5	3	2	2	+	-
m16a-34	La Unión	Hoja	4,0	20,25	3	5	3	2	2	+	-
m20pd	Corpoica	Hoja	2,3	61,50	4	4	1	1	2	+	-
m25pdrb	Pradera	Rama	3,2	35,00	3	2	3	1	2	+	-
m25pdf-50	Pradera	Flor	1,9	87,75	5	1	1	1	2	+	-
M26pdh	Pradera	Hoja	1,9	73,13	4	1	1	1	2	+	-
m3612b	La Unión	Hoja	2,4	nd	nd	4	2	3	2	+	-
m3612sr-46	La Unión	Hoja	3,5	13,00	2	3	2	3	2	+	-
m3612sreg-18	La Unión	Hoja	2,4	11,75	2	4	2	3	2	+	-
m3913sr-30	La Unión	Hoja	2,4	37,5	3	4	2	3	2	-	-
m3brasil b-39	Anserma	Hoja	1,7	81,25	5	1	1	3	2	+	-
m9pdr-45	Pradera	Rama	1,9	48,25	3	1	1	1	2	+	-
m9pdra	Pradera	Rama	2,0	nd	nd	5	1	2	2	+	-
m3brasil-33	Anserma	Hoja	1,9	84,67	5	1	1	1	2	+	-
m8brasila-35	Anserma	Hoja	2,0	74,75	4	1	1	1	2	+	-
mamt4caliz-25	CIAT	Hoja	4,2	6,00	1	5	3	2	1	-	+
qh1m1-24	Quindío	Hoja	3,0	9,75	2	2	3	2	2	+	-
20171	Corpoica	Hoja	2,0	107,25	5	1	1	1	2	+	-
cr26	CIAT	Hoja	3,9	13,5	2	5	3	2	2	+	-
bitaco-	Bitaco	Hoja	2,0	95,75	5	1	1	1	2	+	-
20452	Corpoica	Hoja	1,9	0,00	1	5	1	1	2	+	-
20451Ped-	Corpoica	Pedúnculo	2,1	76,88	4	1	1	4	1	-	+
Cd8- (control cítricos)	Quindío	Hoja	nd	0	1	5	1	1	2	+	-
colleyuca-27 (control yuca)	Tallo	Tallo	1,8	0	1	5	1	4	1	-	+

^a Promedio del diámetro (centímetros) de colonia 72 h después de sembrada en medio PDA + S, basado en cuatro repeticiones. ^b El Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) fue calculado a los 3, 13 y 30 días después de la inoculación. ^c Los aislamientos fueron separados en cinco grupos de patogenicidad basados en la severidad de la enfermedad (ABCPE) en el clon Elita de guanábana. ^d Los aislamientos se separaron, en cinco grupos, con base en el promedio de diámetro del crecimiento de colonia, usando un análisis de conglomerados (Ward) con un nivel de confianza del 97%. ^e Cebadores específicos para *Colletotrichum gloeosporioides*. ^f Cebadores específicos para *Colletotrichum acutatum*. ^g nd: no determinado. + = amplificación positiva con el cebador específico. - = No hubo amplificación con el cebador específico.

permitió la conformación de cuatro grupos que se relacionan con especie y patogenicidad: el primer grupo constituido por 25 aislamientos donde el 92% son altamente patógenos con diámetros de colonia entre 1,8 y 2,6, el restante 8% conformado por 2 aislamientos (m25pdrb y Cd14r-42) con patogenicidad intermedia. Un segundo grupo donde el 88% de los aislamientos presentan patogenicidad baja y diámetros de colonia altos, dos aislamientos (19945-36 y m9pdra) mostraron diámetros de colonia bajos. El tercer grupo conformado por 9 aislamientos heterogéneos en patogenicidad, 28% mostrando baja patogenicidad, 43% con patogenicidad intermedia y otro 28% con una alta patogenicidad. El cuarto grupo genético conformado por cuatro aislamientos de guanábana y uno de yuca de *C. acutatum*, conformando un grupo genético aparte de los aislamientos de *C. gloeosporioides*.

La variabilidad genética observada con esta técnica fue alta, a un coeficiente de similitud de 0,31 hay un agrupamiento total de los aislamientos. Si se tiene en cuenta que el muestreo estuvo restringido en cuanto área de estudio, se puede deducir que existe alta variación en la población del patógeno entre regiones agro-climáticas diferentes, aisladas geográficamente y alta variación dentro de grupos de aislamientos seleccionados previamente por características morfológicas como diámetro de colonia. Esto sugiere la planificación de un muestreo sistemático más amplio dirigido a responder las dudas que surgen de este estudio inicial sobre la población de *C. gloeosporioides*, agente causante de la antracnosis en guanábana.

Estos resultados evidencian la variabilidad existente tanto fenotípica como genética del agente causante de la antracnosis en guanábana. Se confirmó la asociación de dos o más especies de *Colletotrichum* spp. con la enfermedad. Posteriores estudios se requieren para determinar el efecto de cada una de estas especies en el síndrome de la antracnosis

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Corporación Biotec, y al Fondo de Cooperación Española por el soporte financiero, a Cristina Londoño, estudiante de Biología de la Universidad de Antioquia, por su asistencia técnica y a Benjamín Pineda L. por su colaboración en la edición del texto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon M. y Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93 (5): 579-587

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) para patogenicidad de 56 aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos en el Valle del Cauca, inoculados en árboles de guanábana cultivar Elita.

Fuente de variación	No de tratamientos	GL	Patogenicidad (cuadrado medio ¹)	F
Aislamientos	59	58	4758,9619**	18,06
Coeficiente de variación %			40,90	

Nota: El ANOVA se obtuvo de un solo experimento en un diseño de bloques completos al azar con cuatro plantas por tratamientos y cuatro repeticiones; cinco controles (un aislamiento de cítricos, uno de yuca y tres inoculados con agua). ¹Cuadrado medio obtenido para el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE). ** representa significancia en $Pr>F$ 0,0001.

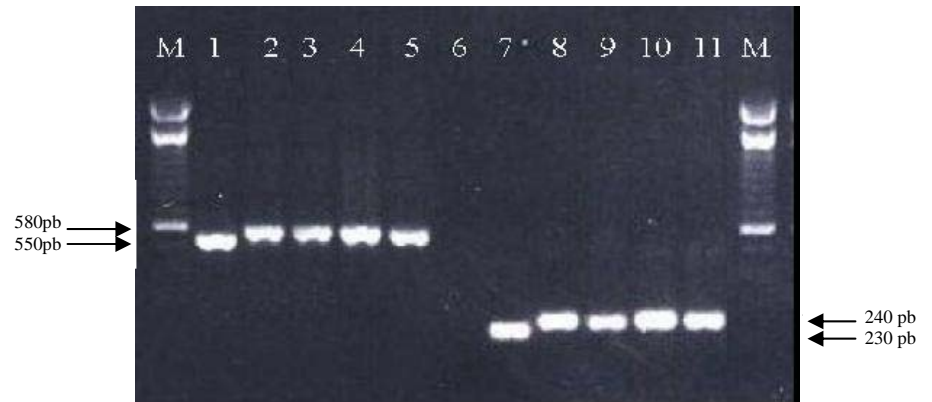


Figura 3. Patrones electroforéticos de los productos de la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal de aislamientos de *Colletotrichum* spp. M = marcador 100 pb; carriles 1 y 7 = ADN de *Phaeoisariopsis griseola*; carriles 2 – 5 = producto amplificado con los cebadores ITS 1-4; carril 6 = control negativo; carriles 8-11 = producto amplificado con los cebadores ITS 1-2.

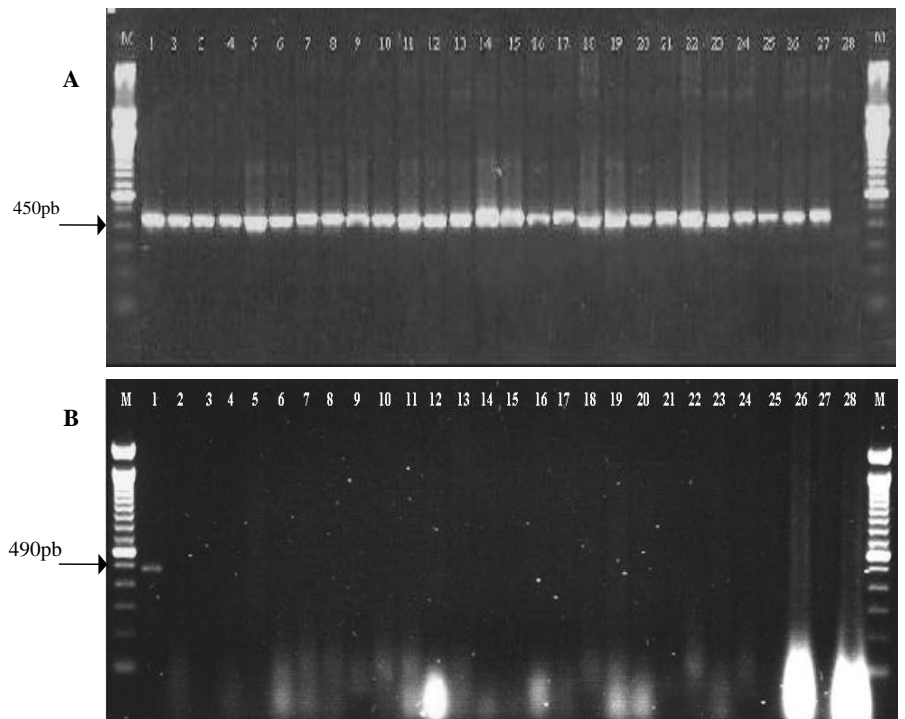


Figura 4. A. Patrones electroforéticos de los productos de la amplificación de fragmentos específicos del ADN ribosomal de aislamientos de *Colletotrichum* spp. usando los cebadores: CgInt-ITS 4, M= marcador de 100pb, carril 1= control positivo *C.gloeosporioides*, Carril 2 - 27 = aislamientos de *Colletotrichum* spp., carril 28= control negativo. **B.** Amplificación de fragmentos específicos del ADN ribosomal de *Colletotrichum* spp. usando cebadores CaInt - ITS 4, carril 1= control positivo *C. acutatum*, carriles 2-27 = aislamientos de *Colletotrichum* spp., carril 28 = control negativo.

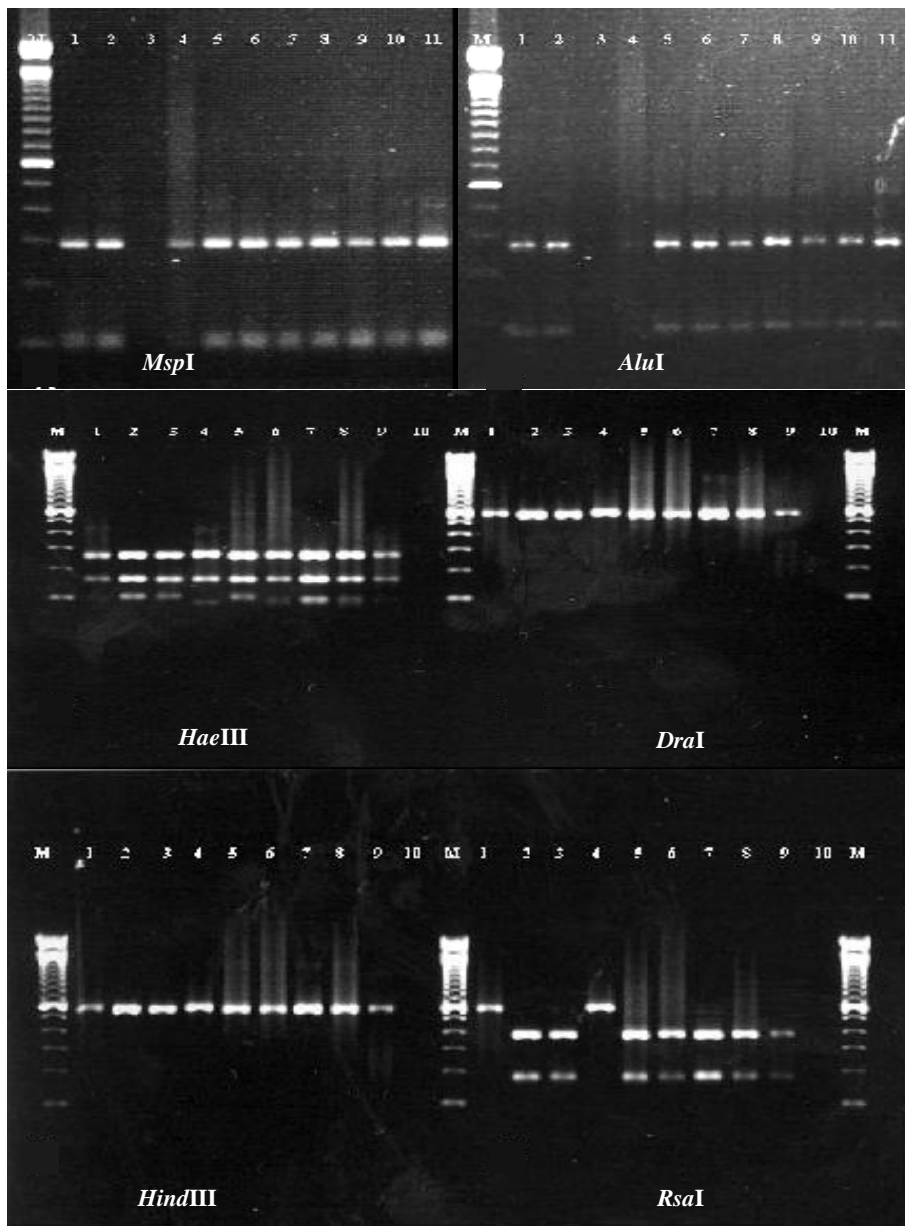


Figura 5. Patrones electroforéticos de los productos obtenidos con PCR-RFLP, con los cebadores ITS 1-4 de diez aislamientos de *Colletotrichum* spp. Patrones monomórficos obtenidos con las enzimas de restricción *Msp* I, *Alu* I, *Dra* I y *Hind* III; patrones polimórficos obtenidos con *Hae* III y *Rsa* I; M: marcador 100pb.

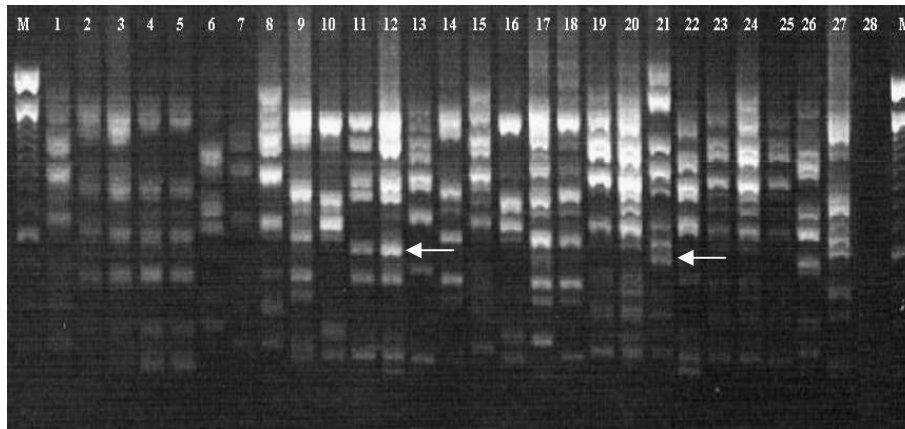


Figura 6. Patrones de bandas que indican el polimorfismo detectado en 28 aislamientos de *Colletotrichum* spp evaluados con el cebador microsatélite CA. Nótese el polimorfismo de los aislamientos 12 y el 20 (Flechas blancas)

Álvarez, E. C., Claro J. L., Loke, J. B., y Echeverri, C. 2001. Diversidad genética y patogénica de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, el hongo causante del Mildeo Polvoso en la rosa en Colombia. Revista Asociflores (Bogotá). No. 58. (Enero - Junio). p. 36-44.

Agostini, J. P. y Timmer. L. W. 1992. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. Plant disease 76:1176-1178.

Aricapa, M. G., y Correa, F. 1994. Almacenamiento de hongos en papel filtro. Ascolfi Informa 20(3): 29 – 30.

Brown, A.E., Sreenivasaprasad, S. y Timmer, L.W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. Phytopathology 86: 523-527

Cabra, J., Sánchez, M., Royero, N., Mejía, A., Schoonhoven, A.V y García, R. 2002. La guanábana: una nutritiva fruta del trópico americano, con un mercado rentable promisorio. En: Taller Guanábana para Colombia y el mundo : Optimización de la cadena productiva. Corporación BIOTEC y CIAT. 27-36p

Escobar, W.y Sánchez, L. 1992. Manual de asistencia técnica ICA # 57. Fruticultura Colombiana. Guanábana. 100pp. PM ediciones.

Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maimon, M. y Shabli, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. Phytopathology 90:608-614.

Freeman, S., Katan, T.,y Shabli, E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1014-1020.

Freeman, S., Katan, T., y Shabli, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. Plant Disease 82: 596-605.

García, R. 2001. Estudio sobre los mercados potenciales de jugo, pulpa, Mermelada y jalea. Contrato de CIDIS con PNUD.

González, M., Rodríguez, R. y Zavala, M. E. 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. Phytopathology 88(4):292-299.

Guzmán, A. F. 1980. La Guanábana Universidad del Tolima (mimeografiado material docente frutales) 33pp

Hantula, J., Dusabenyagasani, M.y Hamelin, R.C. 1996. Random Amplified Microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. European Journal of Forestry Pathology 26:159-166.

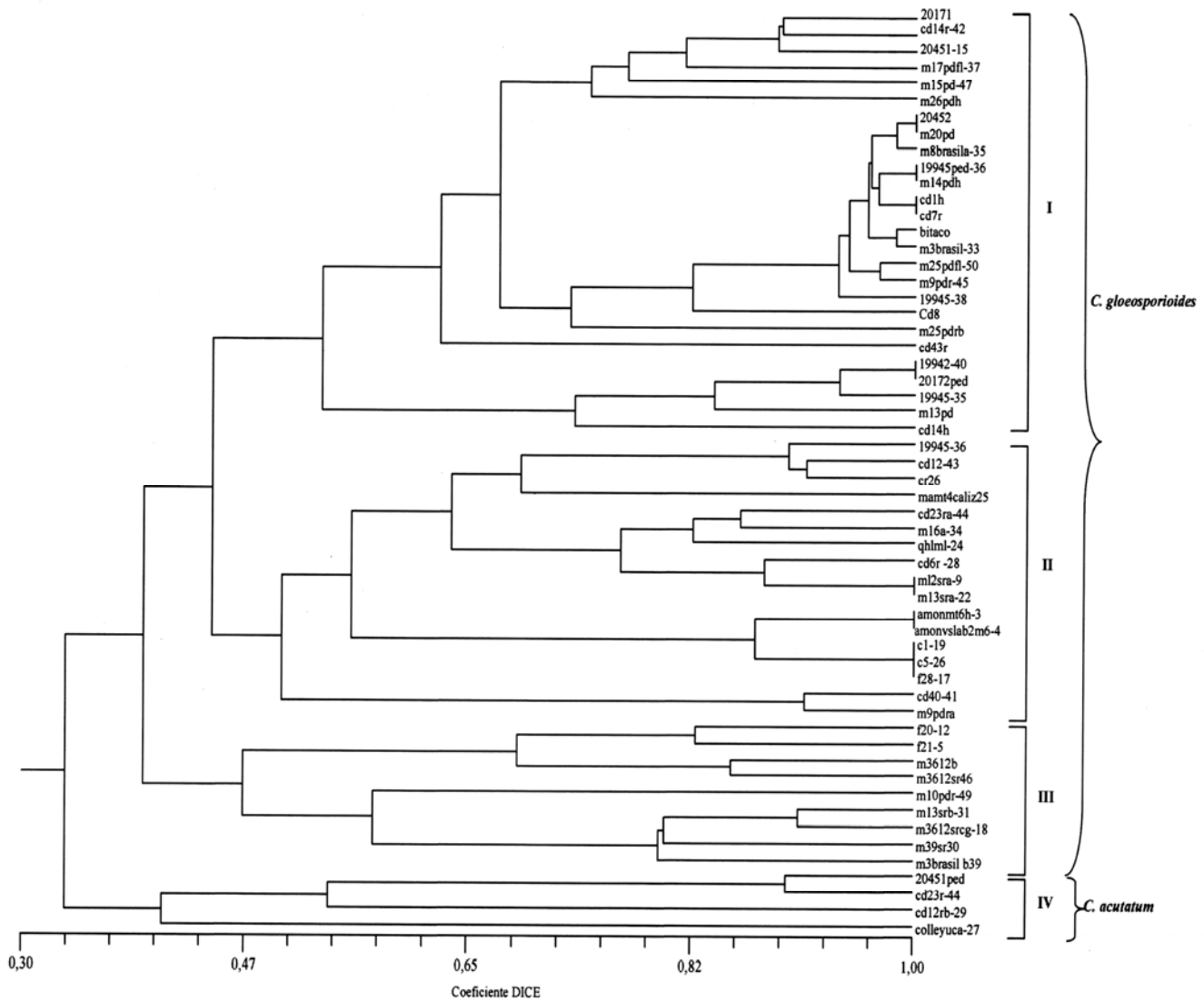


Figura 7. El dendrograma de similitud se basó en el coeficiente de DICE para 56 aislamientos de *Colletotrichum*, usando los datos obtenidos con las enzimas de restricción *Hae* III y *Rsa* I, el cebador RAMs CA y la amplificación con los cebadores específicos *CgInt* y *Calnt2* en combinación con el cebador ITS 4.

- Mahuku, G. S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and Bacterial DNA. *Plant Mol. Biol. Rep* 22: 71-81
- Martín, M. P. y García-Figueres, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* cause anthracnose in olives. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 733-741.
- Ospina, C. A. 2002. Caracterización de poblaciones de *Colletotrichum* spp. causando antracnosis en cítricos, en regiones productoras del oeste de Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 87pp.
- Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R., Meehan, B. M. y Brown, A. E. 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* 39:499-512.
- URPA – Valle del Cauca. 2000. Gobernación del Valle del Cauca, Ministerio de Agricultura, Unidad Regional de Planificación Agropecuaria (URPA).
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in: *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, y J. J. Sninsky, eds. Academic Press, San Diego, C A. p 315-322
- Zárate, R. D. 1981. Estudios etiológicos de las principales enfermedades del guanábano en el Valle del Cauca Facultad de Ciencias Agropecuarias Palmira. 56p.
- Zárate, R. D. 1987. Principales problemas fitosanitarios del guanábano (*Annona muricata* L.) y las medidas preliminares del control. 83-90 p.
- Zárate, R. D. 1998. Enfermedades de la guanábana (*Annona muricata* L.). Tercera edición Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Departamento de Agricultura. 1-31 p.