

# Variación en crecimiento, esporulación y sensibilidad a Benlate de aislamientos suramericanos de *Colletotrichum gloeosporioides*

J. L. Badel y S. Kelemu\*

## Antecedentes

Las especies del género *Stylosanthes* son leguminosas forrajeras y se distribuyen de modo natural en las zonas tropical y subtropical de América Central y del Sur (Williams et al., 1984). Se considera que estas especies son importantes en Australia (Gillard y Winter, 1984), América Central y del Sur (Thomas, 1984), África, Asia y partes del sur de los Estados Unidos (Lenné y Calderón, 1984; Lenné, 1986).

La enfermedad más importante de *Stylosanthes*, y la más diseminada en ese género, es antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Irwin et al., 1984; Lenné et al., 1984). En Colombia se reconoce que la enfermedad ocasiona pérdidas hasta del 100% de la materia seca (CIAT, 1981).

El patógeno es una especie bastante heterogénea compuesta por diversas poblaciones que varían considerablemente, tanto en morfología (Cox e Irwin, 1988) como en patogenicidad (Irwin y Cameron, 1978; Lenné y Burdon, 1990). La población suramericana parece ser muy heterogénea, característica que se ha determinado tanto por análisis de virulencia como por marcadores RAPD (método del ADN polimórfico amplificado aleatoriamente) (Kelemu et al., 1995). En esta población se han encontrado algunos aislamientos recolectados en *S. guianensis*, que son capaces de infectar otras especies de *Stylosanthes* y que podrían representar un tercer biotipo (Kelemu et al., s.f.).

Existen también reportes que demuestran la variabilidad en la tasa de crecimiento y en la esporulación de *C. gloeosporioides*, aislado de varios hospederos. Ogle et al. (1986) encontraron diferencias en la tasa de crecimiento radial de cuatro aislamientos de *C. gloeosporioides* recolectados de *S. guianensis*, *Aeschynomene falcata* y *Centrosema pubescens*.

Una considerable variación en la tasa de crecimiento y en la esporulación se encontró, también, en aislamientos de *C. gloeosporioides* recolectados en cacao (*Theobroma cacao*) y en caucho (*Hevea brasiliensis*) (Purwantara, 1991).

Varios estudios han demostrado la transmisión de *C. gloeosporioides* mediante semilla (Davis, 1987; Ellis et al., 1976; Lenné y Sonoda, 1979). En un muestreo realizado entre 1982 y 1983 en cultivos de *Stylosanthes* en Australia, se encontró que el 21.5% de las vainas recolectadas de cultivos severamente enfermos de *S. scabra* cv. Fitzroy dieron cultivos de *C. gloeosporioides*; cuando se separaron las semillas de las vainas se encontró que sólo el 2.6% de las primeras presentó el hongo en cultivo (Davis et al., 1984).

Un fungicida conocido y muy usado para tratar semillas es Benomil (Benlate). En 1987, Davis encontró que este fungicida es efectivo en la reducción del desarrollo de la antracnosis en semillas de *Stylosanthes* que portaban *C. gloeosporioides*. Por otra parte, varios reportes indican que especies, géneros y taxones superiores de hongos manifiestan sensibilidad diferencial a derivados del bencimidazol (un componente activo del Benomil) (Bollen y Fuchs, 1970; Edgington et al., 1971; Richardson, 1973).

En este estudio se empleó un grupo selecto de aislamientos de *C. gloeosporioides* recolectados de *S.*

\* Respectivamente: asistente de investigación y fitopatóloga del laboratorio de Fitopatología de Forrajes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual de Jorge Luis Badel: Department of Plant Pathology, Kansas State University, Manhattan, KS 66506, EE.UU.

*guianensis*, para determinar en ellos la variación en el crecimiento del micelio, la producción de conidias y la sensibilidad a Benlate.

## Materiales y métodos

**Aislamientos de *C. gloeosporioides*.** En este estudio se evaluaron 77 aislamientos de *C. gloeosporioides*, recolectados entre 1981 y 1994, de infecciones naturales de *S. guianensis* en diferentes regiones de América del Sur. Estos aislamientos pertenecen a la

colección de *Colletotrichum* del Laboratorio de Fitopatología de Forrajes del CIAT (Cuadro 1).

Los aislamientos fueron conservados como cultivos monospóricos liofilizados en ampollitas de vidrio selladas, lo cual garantiza su conservación durante un largo tiempo, e inmediatamente antes de usarlos se recuperaban en un medio de agar-avena.

**Crecimiento radial del micelio.** Se tomaron discos de 4 mm de diámetro del borde de crecimiento activo de un

Cuadro 1. Número CIAT, origen geográfico y año de recolección de los aislamientos de *C. gloeosporioides* empleados en este estudio.

Aislamiento (no. CIAT)	Hospedero (no. CIAT)	Lugar de origen		Año de recolección	Aislamiento (no. CIAT)	Hospedero (no. CIAT)	Lugar de origen		Año de recolección
		País	Localidad				País	Localidad	
10579	184	Perú	Pucallpa	1981	16137	184	Colombia	Caquetá	1994
10643	1391	Colombia	Carimagua	1981	16139	184	Colombia	Caquetá	1994
10775	12	Colombia	Carimagua	1981	16140	184	Colombia	Caquetá	1994
10909	184	Colombia	Quilichao	1981	16141	184	Colombia	Caquetá	1994
11372	184	Brasil	Paragominas	1982	16142	184	Colombia	Caquetá	1994
11932	184	Perú	Pucallpa	1983	16145	184	Colombia	Caquetá	1994
12622	184	Perú	Pucallpa	1983	16146	184	Colombia	Caquetá	1994
13366	184	Colombia	Carimagua	1985	16147	184	Colombia	Caquetá	1994
13373	184	Colombia	Carimagua	1985	16151	184	Colombia	Caquetá	1994
13376	184	Colombia	Carimagua	1985	16162	184	Colombia	Caquetá	1994
13393	184	Colombia	Carimagua	1984	16166	184	Colombia	Caquetá	1994
14101	184	Colombia	Carimagua	1986	16168	184	Colombia	Caquetá	1994
15584	184	Colombia	Carimagua	1987	16170	184	Colombia	Caquetá	1994
16064	10941	Colombia	Carimagua	1994	16172	184	Colombia	Caquetá	1994
16065	11062	Colombia	Carimagua	1994	16173	184	Colombia	Caquetá	1994
16093	1280	Colombia	Caquetá	1994	16176	184	Colombia	Caquetá	1994
16094	1280	Colombia	Caquetá	1994	16179	184	Colombia	Caquetá	1994
16095	1280	Colombia	Caquetá	1994	16181	184	Colombia	Caquetá	1994
16105	11760	Colombia	Carimagua	1994	16182	184	Colombia	Caquetá	1994
16106	11753	Colombia	Carimagua	1994	16191	FM 104	Colombia	Carimagua	1994
16112	184	Colombia	Caquetá	1994	16192	FM 104	Colombia	Carimagua	1994
16113	184	Colombia	Caquetá	1994	16193	FM 9205 P2	Colombia	Carimagua	1994
16114	184	Colombia	Caquetá	1994	16194	FM 9205 P2	Colombia	Carimagua	1994
16117	184	Colombia	Caquetá	1994	16196	FM 9205 P6	Colombia	Carimagua	1994
16118	184	Colombia	Caquetá	1994	16197	FM 104	Colombia	Carimagua	1994
16119	184	Colombia	Caquetá	1994	16198	FM 9205 P6	Colombia	Carimagua	1994
16122	184	Colombia	Caquetá	1994	16200	FM 104	Colombia	Carimagua	1994
16123	184	Colombia	Caquetá	1994	16201	FM 23	Colombia	Carimagua	1994
16124	184	Colombia	Caquetá	1994	16202	FM 0186 P6	Colombia	Carimagua	1994
16125	184	Colombia	Caquetá	1994	16204	FM 0186 P6	Colombia	Carimagua	1994
16128	184	Colombia	Caquetá	1994	16205	FM 9205 P2	Colombia	Carimagua	1994
16131	184	Colombia	Caquetá	1994	16207	FM 9205 P3	Colombia	Carimagua	1994
16132	184	Colombia	Caquetá	1994	16208	FM 104	Colombia	Carimagua	1994
16133	184	Colombia	Caquetá	1994	16209	FM 9205 P2	Colombia	Carimagua	1994
16134	184	Colombia	Caquetá	1994	16215	FM 9205 P3	Colombia	Carimagua	1994
16135	184	Colombia	Caquetá	1994	16216	FM 103	Colombia	Carimagua	1994
16136	184	Colombia	Caquetá	1994	16218	FM 9205 P2	Colombia	Carimagua	1994

cultivo del aislamiento (8 días de edad, en agar-avena) y cada uno se colocó invertido en el centro de una caja Petri que contenía 20 ml de medio fresco de agar-avena; los discos se incubaron a 28 °C con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

El crecimiento radial, en milímetros, se midió 7 días después del inicio del cultivo. Se hicieron cuatro repeticiones de cada tratamiento y el experimento completo se repitió una vez.

**Esporulación.** Después de 7 días de crecimiento en el medio de agar-avena, las conidias se recuperaron de la parte central de cada cultivo, tomando un disco proporcional al radio del micelio; las conidias se suspendieron en agua destilada estéril (5 a 15 ml) y la suspensión se agitó a 300 r.p.m. durante 3 min (Junior Orbit Shaker, LabLine Instruments Inc., Melrose Park, Illinois).

Esta suspensión de conidias se filtró a través de dos capas de gasa y las conidias de la suspensión final se contaron usando un hemacitómetro (Kelemu y Badel, 1994).

**Sensibilidad a Benlate.** Para determinar la dosis discriminadora de Benlate se sembraron cinco aislamientos de *C. gloeosporioides* —numerados como 10643, 10909, 12622, 16135 y 16270— en medio agar-avena suplementado con varias concentraciones del fungicida. Estos aislamientos habían sido recolectados en diferentes regiones de América del Sur.

Se preparó una solución original (stock) de Benlate de 1.2 mg/ml, disolviendo 0.024 g del producto en 20 ml de dimetilsulfóxido (DMSO, molecular biology grade, Fisher Biotech). De esta solución se prepararon tres diluciones con DMSO, en las cuales la concentración final del fungicida era de 120, 60 y 30 µg/ml, respectivamente.

Los medios de cultivo suplementados se prepararon de la siguiente manera: 5 ml de cada dilución, filtrados a través de membranas de Nylon de 0.22 µm (Corning Incorporated, Corning, NY 14831, USA), se añadieron a 600 ml del medio agar-avena fresco esterilizado en autoclave y aún líquido. Este medio se preparó con 20 g de agar (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan), 20 g de harina de avena y 1 lt de agua destilada. Una vez preparados, los medios contenían 1, 0.5 y 0.25 µg/ml de Benlate, respectivamente.

Las cajas Petri testigo contenían agar-avena con la misma concentración de DMSO, pero sin fungicida. Tanto en estas cajas como en las suplementadas con el fungicida, el contenido de DMSO fue menor de 1%.

La sensibilidad de los 77 aislamientos al fungicida se estudió en el medio de agar-avena suplementado con 0.25 µg/ml de Benlate. La inoculación de los aislamientos, las condiciones de crecimiento, la medición del crecimiento radial del micelio y la esporulación se realizaron en la forma que se describió anteriormente. Se hicieron cuatro repeticiones por tratamiento y el experimento completo se repitió una vez.

**Análisis estadístico.** La incubación de las cajas Petri con los diferentes tratamientos se hizo en un diseño de bloques completamente al azar. Para detectar las diferencias genéticas en el crecimiento radial y en la producción de conidias entre los aislamientos, se hizo un análisis de varianza y se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para medir el crecimiento del micelio y la producción de conidias por milímetro cuadrado en un medio agar-avena sin Benlate. Esta última variable se transformó por logaritmo.

Para cuantificar las diferencias en sensibilidad a Benlate que presentaban los aislamientos, se analizó el crecimiento del micelio en el medio agar-avena suplementado con 0.25 µg/ml del fungicida como un porcentaje del testigo.

## Resultados

**Crecimiento del micelio.** El crecimiento del micelio de los 77 aislamientos del hongo varió entre 11.6 y 40.8 mm después de 7 días de cultivo en agar-avena (Figura 1, Cuadro 2). De los 31 aislamientos recolectados en el Centro de Investigaciones

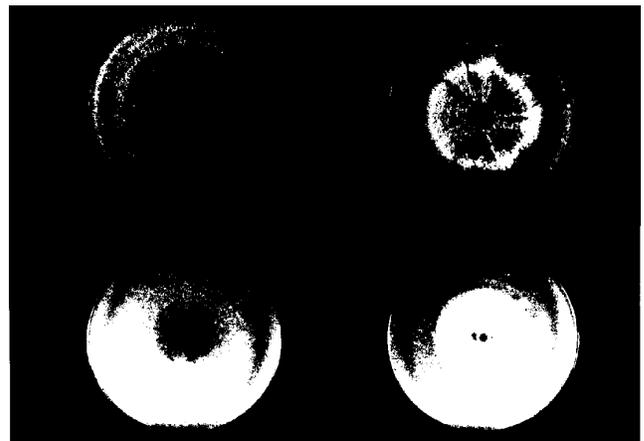


Figura 1. Crecimiento radial del micelio y esporulación en los aislamientos de *C. gloeosporioides* 16064 (arriba-izquierda), 16173 (arriba-derecha), 16200 (abajo-izquierda) y 16143 (abajo-derecha) después de 7 días de cultivo en agar-avena.

Cuadro 2. Crecimiento radial del micelio de aislamientos suramericanos de *C. gloeosporioides* después de 7 días de cultivo en agar-avena.

Aislamiento	Radio (mm)*	Aislamiento	Radio (mm)*	Aislamiento	Radio (mm)*
16064	40.8 (0.4)a	16137	25.8 (1.1)jmiknlh	16133	22.9 (3.0)mponlq
16208	40.1 (0.2)ba	16176	25.4 (0.2)jmioknlh	16143	22.9 (0.2)mponlq
16106	39.5 (1.8)ba	16136	25.3 (0.7)jmioknlh	16216	22.9 (2.3)mponlq
13393	39.1 (0.2)bac	16132	25.1 (0.2)jmpioknlh	16135	22.8 (1.1)mponlq
16193	38.6 (0.5)bac	10579	25.1 (0.5)jmpioknlh	16125	22.6 (0.2)mponq
10643	38.1 (1.6) bdac	13376	25.0 (0.4)jmpioknlh	16151	22.5 (2.8)mponq
10514	38.1 (0.5)bdac	16162	25.0 (2.1)jmpioknlh	16118	22.5 (1.8)mponq
13373	38.0 (0.4)ebdac	16139	24.9 (0.9)jmpioknlh	16141	22.3 (1.8)mponq
16202	37.8 (0.4)ebdac	16173	24.8 (0.4)jmpioknl	16113	22.1 (0.9)mponq
16207	37.4 (0.9)ebdac	16134	24.8 (0.4)jmpioknl	16168	22.1 (5.5)mponq
16198	37.0 (1.1)ebdac	16131	24.6 (1.2)jmpioknl	16142	21.4 (0.4)mponq
16209	37.0 (0.4)ebdac	16179	24.6 (1.6)jmpioknl	16146	21.1 (6.5)mponq
16205	35.8 (2.1)ebdac	16119	24.6 (1.2)jmpioknl	16196	20.9 (6.9)mpornq
16201	35.1 (1.2)ebdfc	16117	24.3 (0.0)jmpoknl	16147	20.4 (6.2)spornq
16215	35.1 (2.7)ebdfc	16144	24.1 (2.3)jmpoknlq	16123	20.1 (2.7)spornq
16218	33.9 (0.5)egdfc	16112	24.1 (0.2)jmpoknlq	16145	20.1 (7.6)spornq
11372	32.9 (2.3)egdf	10909	23.8 (0.6)mpoknlq	16095	19.9 (0.9)sporq
16204	32.8 (1.4)egdf	16128	23.8 (1.1)mpoknlq	14101	19.6 (0.9)sporq
16194	32.6 (1.9)egf	16124	23.6 (0.2)mpoknlq	16094	19.4 (0.9)sprq
15584	30.4 (0.2)gfh	16122	23.5 (1.1)mpoknlq	16191	18.4 (7.2)srq
13366	30.3 (0.7)gifh	10775	23.5 (0.4)mpoknlq	16192	15.5 (0.7)srt
12622	29.8 (3.5)jgifh	16170	23.4 (0.6)mpoknlq	16197	15.3 (0.7)st
16065	28.9 (0.6)jgikh	16181	23.4 (3.4)mpoknlq	16093	11.8 (2.8)t
16105	28.5 (0.4)jgiklh	16114	23.3 (1.4)mpoknlq	16200	11.6 (0.9)t
16172	26.4 (0.2)jmiklh	11932	23.1 (0.5)mponlq		
16166	25.8 (0.4)jmiknlh	16140	22.9 (3.4)mponlq		

\* Promedio, desviación estándar y grupo Duncan: P < 0.0001; los promedios seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Carimagua, 18 de ellos (16064, 16208, 16106, 13393, 16193, 10643, 10514, 13373, 16202, 16207, 16198, 16209, 16205, 16201, 16215, 16218, 16204 y 16194) crecieron significativamente más (P < 0.01) que los recolectados en las otras localidades. En el grupo de los aislamientos con una tasa de crecimiento mayor que la de los demás se encontró el aislamiento 11372, el único que fue recolectado en Brasil.

En general, los aislamientos recolectados en Carimagua tendieron a presentar mayor crecimiento radial (> 28.5 mm) que los recolectados en Caquetá (Colombia), a excepción de los aislamientos 13376, 10775, 16216, 16196, 14101, 16191, 16192, 16197 y 16200; la mayoría de los primeros fueron aislados de *S. guianensis* CIAT 184 y de la línea FM104 generada a partir de esta accesión en el programa de Mejoramiento de Forrajes Tropicales del CIAT. Los aislamientos de las demás regiones presentaron un crecimiento intermedio.

El almacenamiento de los cultivos durante períodos largos de tiempo no afectó el crecimiento, como lo demuestra la alta tasa de crecimiento de algunos aislamientos (10514, 10643, 11372, 12622, 13373 y 13393) que fueron almacenados durante más de 10 años.

**Esporulación.** Se observó una gran variabilidad en la producción de conidias por milímetro cuadrado (Figura 1), no sólo entre diferentes aislamientos sino también dentro de un mismo aislamiento; este resultado se refleja en las desviaciones estándar (Cuadro 3).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 70 de los 77 aislamientos estudiados —que produjeron desde  $6.5 \times 10^3$  hasta  $2.7 \times 10^5$  conidias/mm<sup>2</sup>— a pesar de que se hizo la transformación logarítmica. Tampoco se encontró una tendencia hacia mayor esporulación según el origen del aislamiento, es decir, en relación con el genotipo del cual se hizo el aislamiento.

Cuadro 3. Producción de conidias por aislamientos suramericanos de *C. gloeosporioides* después de 7 días de cultivo en agar-avena.

Aislamiento	Conidias/mm*	Aislamiento	Conidias/mm*	Aislamiento	Conidias/mm*
16182	2.2x10 <sup>5</sup> (3.5x10 <sup>4</sup> )a	16124	1.3x10 <sup>5</sup> (2.8x10 <sup>4</sup> )a	16145	9.7x10 <sup>4</sup> (1.3x10 <sup>5</sup> )ebdac
13373	2.2x10 <sup>5</sup> (3.3x10 <sup>4</sup> )a	16133	1.2x10 <sup>5</sup> (1.0x10 <sup>5</sup> )ba	16209	2.0x10 <sup>4</sup> (5.5x10 <sup>3</sup> )ebdac
10514	2.0x10 <sup>5</sup> (4.7x10 <sup>4</sup> )a	16132	8.3x10 <sup>4</sup> (3.5x10 <sup>4</sup> )bac	16218	7.6x10 <sup>4</sup> (1.0x10 <sup>5</sup> )ebdac
16064	2.1x10 <sup>5</sup> (1.0x10 <sup>5</sup> )a	16135	8.8x10 <sup>4</sup> (5.6x10 <sup>4</sup> )bac	14101	1.5x10 <sup>4</sup> (3.0x10 <sup>3</sup> )ebdac
10643	2.0x10 <sup>5</sup> (8.9x10 <sup>4</sup> )a	10775	9.0x10 <sup>4</sup> (6.7x10 <sup>4</sup> )bac	16201	6.8x10 <sup>4</sup> (9.4x10 <sup>4</sup> )ebdac
16131	1.8x10 <sup>5</sup> (1.4x10 <sup>4</sup> )a	10909	7.5x10 <sup>4</sup> (1.7x10 <sup>4</sup> )bdac	16117	5.6x10 <sup>4</sup> (7.8x10 <sup>4</sup> )ebdac
16139	1.8x10 <sup>5</sup> (3.5x10 <sup>4</sup> )a	16193	7.4x10 <sup>4</sup> (8.7x10 <sup>3</sup> )bdac	16197	1.7x10 <sup>4</sup> (1.6x10 <sup>4</sup> )ebdac
16128	1.7x10 <sup>5</sup> (1.4x10 <sup>4</sup> )a	16162	7.1x10 <sup>4</sup> (2.9x10 <sup>4</sup> )ebdac	16168	1.4x10 <sup>4</sup> (1.2x10 <sup>4</sup> )ebdac
16094	1.9x10 <sup>5</sup> (1.2x10 <sup>5</sup> )a	16144	6.8x10 <sup>4</sup> (2.7x10 <sup>4</sup> )ebdac	16194	3.9x10 <sup>4</sup> (5.4x10 <sup>4</sup> )ebdac
16106	1.7x10 <sup>5</sup> (4.7x10 <sup>4</sup> )a	16170	5.9x10 <sup>4</sup> (7.4x10 <sup>3</sup> )ebdac	16205	1.3x10 <sup>4</sup> (1.2x10 <sup>4</sup> )ebdac
16134	1.6x10 <sup>5</sup> (2.2x10 <sup>4</sup> )a	16112	6.5x10 <sup>4</sup> (4.0x10 <sup>4</sup> )ebdac	13366	1.1x10 <sup>4</sup> (1.1x10 <sup>4</sup> )ebdac
16179	1.6x10 <sup>5</sup> (2.5x10 <sup>4</sup> )a	16118	5.7x10 <sup>4</sup> (2.4x10 <sup>4</sup> )ebdac	16105	7.1x10 <sup>3</sup> (8.6x10 <sup>3</sup> )ebdac
16198	1.5x10 <sup>5</sup> (2.7x10 <sup>4</sup> )a	16114	6.0x10 <sup>4</sup> (3.7x10 <sup>4</sup> )ebdac	16191	7.6x10 <sup>3</sup> (4.6x10 <sup>3</sup> )ebdac
16176	1.5x10 <sup>5</sup> (2.0x10 <sup>4</sup> )a	16122	5.0x10 <sup>4</sup> (2.3x10 <sup>3</sup> )ebdac	16113	5.7x10 <sup>3</sup> (1.6x10 <sup>3</sup> )ebdac
11372	1.5x10 <sup>5</sup> (2.5x10 <sup>4</sup> )a	16065	4.7x10 <sup>4</sup> (4.5x10 <sup>3</sup> )ebdac	16143	3.5x10 <sup>3</sup> (1.9x10 <sup>3</sup> )ebdac
16119	1.5x10 <sup>5</sup> (7.8x10 <sup>3</sup> )a	16192	4.7x10 <sup>4</sup> (5.1x10 <sup>3</sup> )ebdac	10579	2.8x10 <sup>3</sup> (2.4x10 <sup>2</sup> )ebdac
16207	1.5x10 <sup>5</sup> (3.3x10 <sup>4</sup> )a	16151	4.4x10 <sup>4</sup> (1.2x10 <sup>4</sup> )ebdac	16216	2.6x10 <sup>3</sup> (6.3x10 <sup>2</sup> )ebdac
16204	1.4x10 <sup>5</sup> (2.4x10 <sup>4</sup> )a	16142	5.8x10 <sup>4</sup> (5.8x10 <sup>4</sup> )ebdac	16196	6.5x10 <sup>3</sup> (8.6x10 <sup>3</sup> )ebdac
16202	1.4x10 <sup>5</sup> (3.7x10 <sup>4</sup> )a	16181	1.0x10 <sup>5</sup> (1.4x10 <sup>5</sup> )ebdac	16123	7.1x10 <sup>2</sup> (1.2x10 <sup>2</sup> )ebdfc
16173	1.4x10 <sup>5</sup> (5.0x10 <sup>3</sup> )a	16140	4.4x10 <sup>4</sup> (3.7x10 <sup>4</sup> )ebdac	16215	1.6x10 <sup>5</sup> (2.2x10 <sup>5</sup> )edfc
16136	1.4x10 <sup>5</sup> (3.8x10 <sup>3</sup> )a	16137	4.4x10 <sup>4</sup> (4.9x10 <sup>4</sup> )ebdac	16146	9.2x10 <sup>4</sup> (1.3x10 <sup>5</sup> )edf
16166	1.4x10 <sup>5</sup> (2.1x10 <sup>4</sup> )a	16125	2.6x10 <sup>4</sup> (6.6x10 <sup>3</sup> )ebdac	16141	5.9x10 (8.4x10)gf
12622	1.4x10 <sup>5</sup> (1.3x10 <sup>5</sup> )a	11932	2.6x10 <sup>4</sup> (5.0x10 <sup>3</sup> )ebdac	13376	5.8x10 (8.1x10)gf
16200	1.3x10 <sup>5</sup> (2.1x10 <sup>4</sup> )a	16147	8.0x10 <sup>4</sup> (1.1x10 <sup>5</sup> )ebdac	15584	3.3 (1.8)g
16208	1.6x10 <sup>5</sup> (1.5x10 <sup>5</sup> )a	16172	2.4x10 <sup>4</sup> (1.2x10 <sup>4</sup> )ebdac		

\* Promedio, desviación estándar y grupo Duncan de la transformación log(x+1): P < 0.0001; los promedios seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes.

**Sensibilidad a Benlate.** Debido a la alta variabilidad observada en la esporulación de los aislamientos, la sensibilidad a Benlate se midió por su efecto en el crecimiento del micelio. Para evitar las diferencias genéticas que pudieran existir entre los aislamientos respecto a esa característica solamente (esporulación variable) —sin relacionarla en absoluto con la sensibilidad al fungicida— los datos de esta última se presentan como porcentajes en relación con el testigo.

A pesar de la gran variabilidad en la inhibición causada por Benlate al crecimiento radial de los cultivos, se observó que los aislamientos recolectados en Carimagua tendieron a exhibir mayor sensibilidad al fungicida que los recolectados en Caquetá (Cuadro 4). A excepción de los aislamientos 16093, 16094 y 16095, aislados de *S. guianensis* CIAT 1280, que presentaron inhibiciones de 86%, 90,5% y 93.3%, respectivamente, los demás aislamientos recolectados en Caquetá no fueron inhibidos más de 58.8%.

Por el contrario, el crecimiento radial de la gran mayoría de los aislamientos de Carimagua fue inhibido en 50% o más, a excepción de los aislamientos 15584, 16105, 13376 y 16215. De los 31 aislamientos recolectados en Carimagua, 15 de ellos (16218, 16200, 13393, 16208, 10775, 16191, 14101, 16209, 13366, 13373, 10514, 10643, 16064, 16106 y 16205) fueron significativamente más inhibidos que 16 de los 41 que se recolectaron en Caquetá (16141, 16123, 16113, 16143, 16192, 16168, 16118, 16137, 16172, 16125, 16117, 16151, 16112, 16170, 16181 y 16122).

## Discusión

**Variabilidad genética.** El crecimiento radial del micelio, la esporulación y la sensibilidad al fungicida Benlate (Benomil) del grupo estudiado de 77 aislamientos de *C. gloeosporioides* demuestran claramente la gran variabilidad que existe en la población suramericana de este patógeno que afecta el género *Stylosanthes*.

Cuadro 4. Crecimiento radial del micelio de aislamientos suramericanos de *C. gloeosporioides* en agar-avena, suplementado con 0.25 mg/ml de Benlate.

Aislamiento	Radio del micelio (% del testigo)*	Aislamiento	Radio del micelio (% del testigo)*	Aislamiento	Radio del micelio (% del testigo)*
15584	79.0 (0.8)a	11932	50.8 (1.1)gnfmkljhi	16182	42.2 (1.6)pntrmklojsrq
16105	75.5 (1.0)ba	16147	50.2 (2.3)gnfmkljhi	16193	40.8 (3.1)pntrmklojsrq
16141	73.3 (7.7)ba	16136	50.1 (6.3)gnfmkljhi	16201	40.4 (9.1)pntrmklojsrq
16123	71.8 (3.0)ba	16198	50.0 (0.5)gnfmkljhi	16218	39.4 (14.5)pntrmklojsrq
10909	69.1 (3.9)bac	16114	49.8 (6.9)gnfmkljhi	16200	38.7 (0.1)pntrmosurq
16113	67.2 (2.9)bdac	16216	49.1 (4.3)pgnfmkljhi	13393	37.7 (10.1)pntrmosurq
16143	64.5 (2.1)bdec	16166	49.0 (1.4)pgnfmkljhi	16208	37.1 (4.7)ptvosurq
16192	59.2 (1.1)fddec	16065	48.6 (4.7)pgnfmkljhiq	10579	36.8 (4.9)ptvosurq
16168	58.6 (12.1)gfdec	16133	48.4 (3.7)pgnfmkljhiq	10775	35.7 (1.7)ptvwsurq
16118	56.5 (3.5)gfdeh	16145	47.8 (6.8)pgnfmkljhiq	16191	35.6 (12.8)ptvwsurq
16137	55.9 (1.6)gfdeh	16179	47.8 (4.3)pgnfmkljhiq	14101	35.2 (2.7)tvwsurq
16172	55.5 (0.9)gfdehi	16134	47.7 (0.5)pgnfmkljhiq	16209	34.3 (0.5)xtvwsur
13376	55.5 (4.2)gfdehi	16207	47.6 (2.0)pgnfmkljhiq	13366	32.7 (3.4)xtvwsu
16215	55.5 (6.1)gfdejhi	16124	47.4 (3.7)pgnfmkljhiq	13373	31.5 (5.3)xtvwu
16125	54.6 (4.5)gfdejhi	16146	46.9 (4.5)pgnfmkljhiq	10514	27.2 (1.0)xyvwu
16117	53.8 (3.0)gfkejhi	16176	46.8 (1.8)pgnfmkljshriq	11372	24.5 (8.0)xyvwz
16151	53.7 (5.2)gfkejhil	16204	45.6 (7.2)pgnfmkljshriq	10643	23.1 (2.9)xywz
16112	53.5 (0.3)gfkejhi	16119	45.6 (3.4)pgnfmkljshriq	16064	21.8 (2.4)xyz
16170	53.2 (0.6)gfkejhi	16131	45.5 (0.6)pgnfmkljshriq	16106	19.1 (4.5)yz
16181	52.9 (9.0)gfklejhi	16173	45.5 (3.6)pgnfmkljshriq	12622	15.9 (22.5)ygaz
16122	52.6 (1.4)gfklejhi	16197	45.1 (2.6)pgnfmkljshriq	16093	14.0 (9.6)cgaz
16140	52.4 (1.6)gfmklejhi	16196	44.9 (7.3)pntrmklojsriq	16094	9.5 (6.4)cga
16142	51.6 (1.3)gfmklejhi	16194	44.4 (7.4)pntrmklojsriq	16095	6.7 (9.5)cgn
16135	51.3 (6.6)gnfmklejhi	16144	44.2 (2.1)pntrmklojsriq	16205	3.6 (5.0)c
16132	51.3 (0.3)gnfmklejhi	16202	43.7 (0.6)pntrmklojsriq		
16162	51.2 (3.0)gnfmklejhi	16128	42.1 (7.4)pntrmklojsriq		

\* Promedio, desviación estándar y grupo Duncan: P < 0.0001. Los promedios seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Fitopatología de Forrajes del CIAT sobre los patrones de virulencia de esa población demostraron la existencia de 62 patotipos. Estos han sido determinados según la reacción que manifiestan en 17 genotipos diferenciales de *S. guianensis* inoculados con ellos (CIAT, 1995; Kelemu et al., s.f.), no pudiendo ser discriminados por los cuatro diferenciales de *S. guianensis* (cv. Endeavour, cv. Cook, cv. Graham y CPI 18750) que se emplean para estudiar la población australiana del patógeno (Irwin et al., 1986).

Esta alta variabilidad es explicable si se considera que América del Sur es el centro de origen del género *Stylosanthes*; por tanto, posiblemente también puede ser el centro de diversidad genética de su principal patógeno. La información obtenida coincide, además, con la variabilidad observada en las poblaciones de *C. gloeosporioides* recolectadas tanto en *Stylosanthes* como en otros hospederos (Ogle et al., 1986; Purwantara, 1991).

El método empleado en este estudio permite, después de 7 días de cultivo en agar-avena, observar una gran variabilidad en la producción de conidias entre los aislamientos y aun entre repeticiones de un mismo aislamiento. Esta variabilidad impide la comparación clara y confiable, no sólo de la característica misma —producción de conidias—, sino también de la sensibilidad al Benlate manifestada por la esporulación.

**Respuesta diferencial.** Se encontró en el laboratorio del CIAT que los aislamientos recolectados en Carimagua tienen una tendencia general a desarrollar una tasa de crecimiento del micelio mayor que la de otros aislamientos y a manifestar una sensibilidad al Benlate menor que ellos.

Aunque la correlación encontrada entre el crecimiento radial y la sensibilidad al fungicida (0.25 µg/ml) fue baja ( $r = -0.2608$ ), 13 de los 17 aislamientos de mayor crecimiento recolectados en Carimagua fueron inhibidos en más del 60%.

La estación experimental Carimagua ha sido para el CIAT el sitio de evaluación de la resistencia a antracnosis y allí se ha seleccionado el germoplasma de *Stylosanthes*. Esta selección, que ha sido continua desde sus inicios y se ha mantenido por largo tiempo, pudo causar dos efectos: (1) favorecer la evolución del patógeno hacia formas más agresivas que implicarían una tasa de crecimiento mayor; (2) aumentar la probabilidad de que el patógeno desarrolle y exprese mayor virulencia —en lugar de mayor tolerancia— frente a la resistencia que ofrece el hospedero, ya que el uso del fungicida está restringido en los lotes de selección.

En esta misma población se han hecho análisis con marcadores RAPD y estudios de patogenicidad, demostrando ambos que la diversidad, tanto genética como patogénica, de los aislamientos procedentes de Carimagua es mayor que la encontrada en otras localidades (Kelemu et al., 1995).

**Transmisión por semilla.** Las semillas suelen ser sitios de infección atractivos para los patógenos, debido a que proveen medios para la supervivencia del patógeno en generaciones sucesivas del hospedero y sirven de vehículo para el movimiento del patógeno de una región geográfica a otra (Harman, 1983).

Se ha demostrado que *C. gloeosporioides* puede transmitirse por las semillas, una vez se ha establecido en ellas (Davis, 1987; Ellis et al., 1976; Lenné y Sonoda, 1979). Existe, por tanto, la posibilidad de que cepas altamente virulentas del patógeno puedan diseminarse mediante la venta o el movimiento de semilla infectada desde las áreas de producción a zonas con pasturas de gramíneas y leguminosas comerciales. Por consiguiente, es necesario conocer la sensibilidad de las poblaciones del patógeno a determinados fungicidas para controlarlo en forma rápida y eficiente, ya sea en la semilla o en el campo.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Ximena P. Bonilla, técnica de investigación del Laboratorio de Fitopatología de Forrajes Tropicales del CIAT, por su valiosa colaboración durante la ejecución de este proyecto.

## Summary

The mycelial growth, sporulation and sensitivity to the fungicide Benlate of a selected group of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of anthracnose of *Stylosanthes*, collected from naturally occurring infection in different regions of South America were studied. The mycelial radial growth ranged from 11.6 to 40.8 mm

after 7 days of culturing on oatmeal agar medium (OMA), with a significantly higher growth rate of most isolates collected in Carimagua, Colombia, a selection and breeding site for species of *Stylosanthes*. No significant difference in sporulation among 70 out of the 77 studied isolates was found. The sensitivity to Benlate, measured as mycelial radial growth after 7 days of culturing on OMA amended with 0.25 µg/ml Benlate —taking the radius as a percent of the control— ranged from 3.6% to 79.0% with a tendency to a higher sensitivity of the isolates collected in Carimagua. The results confirm the high variability of the South American population of the pathogen.

## Referencias

- Bollen, G. J. y Fuchs, A. 1970. On the specificity of the in vitro and in vivo antifungal activity of benomyl. *Neth. J. Plant Pathol.* 76:299-312.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1981. Annual Report, 1981. Cali, Colombia.
- \_\_\_\_\_. 1995. Annual Report, 1995. Cali, Colombia.
- Cox, M. L. e Irwin, J. A. G. 1988. Conidium and appresorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. *Aust. Syst. Bot.* 1:139-149.
- Davis, R. D. 1987. Seedborne *Colletotrichum gloeosporioides* infection and fungicidal control in *Stylosanthes* spp. *Seed Sci. Technol.* 15:785-791.
- \_\_\_\_\_; Irwin, J. A. G.; y Cameron, D. F. 1984. Variation in virulence and pathogenic specialisation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes scabra* cv. Fitzroy and cv. Seca. *Aust. J. Agr. Res.* 35:653-662.
- Edgington, L.; Khew, K. L.; y Barron, G. L. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology* 61:42-44.
- Ellis, M. A.; Ferguson, J. E.; Grof, B.; y Sinclair, J. B. 1976. Transmission of *Colletotrichum gloeosporioides* and effect of sulfuric acid scarification on internally-borne fungi in seeds of *Stylosanthes* spp. *Plant Dis. Rep.* 60:844-845.
- Gillard, P. y Winter, W. H. 1984. Animal production from *Stylosanthes* pastures in Australia. En: Stace, H. M. y Edey, L. A. (eds.). *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Academic Press, Sydney, Australia. p. 405-432.
- Harman, G. E. 1983. Mechanisms of seed infection and pathogenesis. *Phytopathology* 73:326-329.
- Irwin, J. A. G. y Cameron, D. F. 1978. Two diseases in *Stylosanthes* spp. caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Australia and pathogenic specialization with one of the causal organisms. *Aust. J. Agric. Res.* 29:305-317.

- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; Davis, R. D.; y Lenné, J. M. 1986. Anthracnose problems with *Stylosanthes*. Tropical Grassland Society Occasional Publication 3:38-46.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; y Lenné, J. M. 1984. Responses of *Stylosanthes* to anthracnose. En: Stace, H. M. y Edye, L. A. (eds.). The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Sydney, Australia. p. 295-310.
- Kelemu, S. y Badel, J. L. 1994. *In vitro* inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and other phytopathogenic fungi by an amazonian isolate of *Bacillus subtilis* and its cell-free culture filtrate. Australas. Plant Pathol. 23:41-45.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; Moreno, C. X.; y Miles, J. W. s.f. Virulence spectrum of South American isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* on selected *Stylosanthes guianensis* genotypes. Plant Dis. 80:1355-1358
- \_\_\_\_\_; Moreno, C. X.; Rodríguez, M. X.; y Badel, J. L. 1995. Genetic diversity among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* infecting forage legume *Stylosanthes* spp. Phytopathology 85:1201.
- Lenné, J. M. 1986. Recent advances in the understanding of anthracnose of *Stylosanthes* in tropical America. En: Proceedings of the XV International Grassland Congress, Kyoto, Japón. p. 773-775.
- \_\_\_\_\_ y Burdon, J. J. 1990. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. Phytopathology 80:728-731.
- \_\_\_\_\_ y Calderón, M. A. 1984. Disease and pest problems of *Stylosanthes*. En: Stace, H. M. y Edye, L. A. (eds.). The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Sydney, Australia. p. 279-294.
- \_\_\_\_\_ y Sonoda, R. M. 1979. The effect of seed inoculation with *Colletotrichum* spp. on emergence, survival and seedling growth of *Stylosanthes hamata*. Trop. Grassl. 13:106-109.
- \_\_\_\_\_; Thomas, D.; de Andrade, R. P.; y Vargas, A. 1984. Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of *Stylosanthes capitata*: Implications for future disease evaluation of indigenous tropical pasture legumes. Phytopathology 74:1070-1073.
- Ogle, H. J.; Irwin, J. A. G.; y Cameron, D. F. 1986. Biology of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from tropical pasture legumes. Aust. J. Bot. 34:537-550.
- Purwantara, A. 1991. Growth and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from cacao and rubber. Menara-Perkebunan (Indonesia) 59:12-21
- Richardson, L. T. 1973. Adaptive tolerance of *Fusarium solani* to benzimidazole derivatives in vitro. Can. J. Bot. 51:1725-1732.
- Thomas, D. 1984. Global ventures in *Stylosanthes*; 1: South America. En: Stace, H. M. y Edye, L. A. (eds.). The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Sydney, Australia. p. 451-466.
- Williams, R. J.; Reid, R.; Schultze-Kraft, R.; Sousa Costa, N. M.; y Thomas, B. D. 1984. Natural distribution of *Stylosanthes*. En: Stace, H. M. y Edye, L. A. (eds.). The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Sydney, Australia. p. 73-102.