

# CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSANTE DE LA ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL, MANZANO Y MORA

Por

Alegría Saldarriaga-Cardona<sup>1</sup>, Jairo Castaño-Zapata<sup>2</sup>, Rafael Arango-Isaza<sup>3</sup>

## Resumen

**Saldarriaga-Cardona, A., J. Castaño Zapata, R. Arango Isaza:** Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **32**(123): 145-156, 2008. ISSN 0370-3908.

La Antracnosis es una enfermedad que en Colombia causa pérdidas superiores al 50% en tomate de árbol, manzano y mora. Se ha reportado al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* como el agente causal de la enfermedad; su manejo se basa fundamentalmente en la aplicación de fungicidas, con resultados poco satisfactorios, lo que motivó la realización de estudios de la verdadera etiología de la enfermedad. La caracterización morfológica del hongo se complementó mediante pruebas moleculares usando oligonucleótidos específicos, dando como resultado que *C. acutatum* es el agente causal de la enfermedad, permitiendo además diferenciar a *C. gloeosporioides* de *C. acutatum*.

**Palabras clave:** antracnosis, caracterización, *Colletotrichum*, tomate de árbol, manzano, mora.

## Abstract

In Colombia the anthracnose is a disease that causes losses higher than 50% in tamarillo, apple and blackberry cultivars. *Colletotrichum gloeosporioides* has been reported as the causal agent of the disease. The management of this has been based on the application of fungicides without satisfactory results, which motivated research on the true etiology of the disease. Molecular studies demonstrated that, *C. acutatum* is the causal agent of the anthracnose, furthermore allowing to differentiate *C. gloeosporioides* from *C. acutatum*.

**Key words:** anthracnose, characterization, *Colletotrichum*, tamarillo, apple, blackberry.

<sup>1</sup> CORPOICA, C.I La Selva, Rionegro.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales.

<sup>3</sup> Corporación para Investigaciones Biológicas –CIB, Medellín y Universidad Nacional de Colombia

## Introducción

En Colombia los cultivos de tomate de árbol [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.], mora (*Rubus glaucus* Benth.) y manzano (*Malus domestica* Borkh.), son severamente afectados por la Antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum* spp., y se reporta tradicionalmente a *Colletotrichum gloeosporioides* como causante de la enfermedad. Dicha enfermedad afecta tanto en precosecha como en postcosecha, y puede llegar a ocasionar pérdidas superiores al 50% en estos cultivos (Osorio, 2003; Ávila *et al.*, 2003; Botero *et al.*, 2003; Botero, 2001; Corpoica, 1999; Salazar, Castaño-Zapata y Castaño, 1997).

La demanda de alternativas para el manejo de la enfermedad ha creado la necesidad de realizar estudios básicos orientados hacia el diagnóstico y caracterización de las especies. La identificación correcta de un organismo permite conocer los patrones de comportamiento de la especie o del grupo taxonómico, facilita el acceso a la información científica y técnica generada, que se pueda aplicar en el desarrollo de alternativas tecnológicas para la estructuración de planes de manejo de la enfermedad. Además, el conocimiento de la especie del hongo que predomina en una plantación es importante, teniendo en cuenta que las especies de *Colletotrichum* pueden diferir en la sensibilidad a los fungicidas (Schilder, 2003; Corpoica, 1998).

La diferenciación y el diagnóstico de las especies de *Colletotrichum* se ha basado en caracteres morfológicos, principalmente tamaño y forma de las conidias, presencia de setas, esclerocios, forma del apresorio, color y aspecto de la colonia, y otras características como tasa de crecimiento, sensibilidad a benomil, temperatura óptima de crecimiento, existencia del teleomorfo y especificidad de hospedantes (Martínez-Culebras *et al.*, 2000; Freeman, Katan y Shabi, 1998; Adaskaveg y Hartin, 1997; Bailey y Jeger, 1992); sin embargo, estas características no han sido satisfactorias para la diferenciación de las especies del hongo, debido a factores como la plasticidad e inestabilidad de los rasgos morfológicos, la existencia de formas intermedias en la morfología, la superposición fenotípica, los efectos ambientales sobre los rasgos morfológicos, además de la falta de unificación y estandarización de los protocolos y condiciones de trabajo entre los investigadores, lo cual ha conducido a que un aislamiento del hongo pueda ser identificado como una u otra especie dependiendo de los criterios individuales del investigador (Freeman, Katan y Shabi, 1998).

Teniendo en cuenta que los métodos tradicionales han sido poco satisfactorios para la diferenciación entre especies y subespecies de *Colletotrichum*, las técnicas

moleculares se están utilizando para este propósito; es así como actualmente se ha determinado la secuencia de nucleótidos de la región ITS1 de varias especies de *Colletotrichum* para construir cebadores específicos, que utilizados con el cebador de secuencia conservada ITS4 amplifican por PCR determinados segmentos de ADN, y permiten diferenciar especies del complejo *Colletotrichum* (Freeman, Katan y Shabi, 1998; Adaskaveg y Hartin, 1997; Brown, Sreenivasaprasad y Timmer, 1996).

Estudios realizados por Adaskaveg y Hartin (1997) para la diferenciación de especies de *Colletotrichum* en frutales (almendro, fresa, durazno, manzana, cítricos y papaya) procedentes de diferentes zonas, permitieron la síntesis de cebadores específicos para *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae* que han sido útiles para el diagnóstico y detección de las especies del hongo.

El presente trabajo se realizó con el propósito de determinar el hongo causante de la Antracnosis que afecta los cultivos de tomate de árbol, mora y manzano en los departamentos de Antioquia y Caldas utilizando caracteres morfológicos y análisis moleculares.

## Materiales y métodos

La investigación se inició con el muestreo en las zonas productoras de tomate de árbol, mora y manzana en los departamentos de Antioquia y Caldas ubicadas a alturas comprendidas entre 2.000 y 2.550 m.s.n.m. En los cultivos de tomate de árbol y manzano las muestras provenían de frutos con síntomas de Antracnosis; los frutos de tomate de árbol tenían diferentes estados de desarrollo, y los de manzana se encontraban en estado de maduración. De mora se tomaron muestras de tallos con síntomas de Antracnosis.

En Antioquia, se realizaron los muestreos de tomate de árbol en los municipios de Entreríos (veredas Pio XII, Cuatroesquinas y Tesorero), Santa Rosa de Osos (veredas Teresitas, Malambo, Orobajo, La Muñoz y Balcones) y Rionegro (vereda Llanogrande). En el cultivo de la mora se tomaron las muestras en Guarne (veredas Hojas Anchas, Santa Clara y La Clarita), Rionegro (vereda Playa Rica) y Medellín (vereda El Llano del corregimiento de Santa Elena).

En Caldas, se muestrearon los cultivos de tomate de árbol en los municipios de Manizales (vereda Maltería) y Villamaría (hacienda-Cuba). Las muestras de manzana se tomaron en Villamaría (veredas Valles y La Florida) y Manizales (localidades de Chulca y Paraíso). También se colectaron muestras de esta fruta en el municipio de Riosucio (vereda El Oro).

### **Elaboración del cepario: codificación, aislamiento y conservación de las cepas de *Colletotrichum***

Las muestras codificadas se procesaron individualmente mediante un lavado con agua corriente, luego se sumergieron durante 2 min. en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5%; seguidamente se enjuagaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril; en la cámara de flujo laminar se tomaron del borde de la lesión porciones de 2 mm<sup>2</sup> de tejido vegetal. Estas porciones se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo PDA-acidificado (PDA, 39 g L<sup>-1</sup> de agua), ajustando el pH a 5.6 con ácido láctico al 0.2%. En cada caja de Petri se sembraron distribuidas en forma equidistante 5 porciones del tejido, sellando los bordes de la caja con Vinilpel (P.V.C Plásticos vinílicos de Colombia Ltda.). Las cajas se rotularon y se colocaron a incubar en condiciones asépticas a 17°C ambiente del laboratorio. Cada 24 h se verificó el crecimiento y pureza del hongo. Transcurridos 5 a 8 días de incubación cuando se obtuvieron las cepas puras, se tomó de cada una de ellas porciones de 3x3 mm y se resembraron en tubos de ensayo de 25 mL de capacidad, con medio de cultivo agar Sabouraud (medio de cultivo a base de peptona 30 g, agar 18 g y agua destilada 1000 mL; ajustando el pH a 5.5 con ácido láctico al 0.2%) (Saldarriaga, 2006; Herrera, 1985). Una vez que las cepas colonizaron la superficie del medio se les adicionó aceite mineral estéril cubriéndolas completamente, luego se conservaron en nevera a 5°C.

### **Obtención de cultivos monospóricos, pruebas de patogenicidad y caracterización morfológica de los aislamientos**

**Cultivos monospóricos:** A partir del cepario conservado se procedió a realizar resiembras en cajas de Petri con agar Sabouraud, cuando en estas se observó la esporulación del hongo se tomó parte de la masa de conidias y se llevó a un vial con 2 mL de agua destilada estéril, se agitó manualmente la suspensión y se vació en cajas de Petri de 9 cm de diámetro servidas cada una con 10 mL de agar-agua al 15/1000 (agar producto comercial de la Oxoid), se retiró el exceso de agua de la caja de Petri y se colocó a incubar en posición invertida a temperatura ambiente del laboratorio (20°C) por 24 h, al cabo de las cuales se realizaron observaciones al microscopio para detectar la germinación de las conidias y proceder a seleccionar y tomar una conidia que se transfirió a una nueva caja de Petri con PDA-acidificado, la cual se selló y colocó a incubar en condiciones de laboratorio. Este procedimiento se realizó a cada una de las cepas conservadas para la obtención de los cultivos monospóricos, los cuales también fueron conservados en tubos de ensayo de 25 mL en las condiciones ya descritas (Saldarriaga, 2006; Botero, 2001).

**Pruebas de patogenicidad:** Cada uno de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. fue sometido a una prueba de patogenicidad en su respectivo hospedante. La prueba en tomate de árbol se hizo sobre frutos pintones previamente lavados con agua corriente y desinfectados por inmersión en hipoclorito de sodio al 2% durante 1 min, e inmediatamente enjuagados con agua destilada estéril y colocados en cámaras húmedas consistentes en cajas de plástico transparente de 25 x 17 x 12 cm equipadas con la respectiva tapa y una rejilla plástica sobre la cual se depositaron 10 frutos/caja, durante 7 días, al cabo de los cuales se revisaron para descartar infecciones de campo; verificado lo anterior, se realizaron las inoculaciones con el hongo usando las metodologías de Saldarriaga (2006), Botero (2001) y Corpoica (1999). Igual procedimiento se llevó a cabo en frutos maduros de manzana. Las pruebas de patogenicidad en mora se realizaron en los tallos de las ramas principales de plantas de 5.5 meses de edad cultivadas en condiciones de invernadero siguiendo la metodología descrita por Saldarriaga (2006). Las variables registradas fueron: número de aislamientos patogénicos, periodo de incubación del hongo (tiempo transcurrido para la manifestación de síntomas de Antracnosis), periodo de latencia (aparición de masas conidiales), tamaño de lesiones y estado de los frutos al cabo de 22 días de la inoculación.

Se utilizó un diseño completamente al azar con 41 tratamientos y 10 repeticiones. El análisis de varianza y la prueba de Duncan al 5% se realizaron para la variable diámetro de lesiones en los frutos de tomate de árbol y manzana. En las plantas de mora sólo se observó la presencia o no de los síntomas de la enfermedad en los tallos.

**Caracterización morfológica de los aislamientos:** De los cultivos monospóricos conservados, se seleccionaron y reactivaron los aislamientos que resultaron patogénicos al hospedante del cual se aislaron, como también un aislamiento no patogénico al mismo hospedante; a estos se les realizó la caracterización y el diagnóstico molecular. Cada aislamiento reactivado se repicó en 10 cajas de Petri de 9 cm de diámetro con PDA-acidificado. Para la resiembra se tomó, con un sacabocados, de la parte media de la cepa del hongo reactivado un disco de 0.5 cm de diámetro que se depositó en el centro de cada caja de Petri. Las cajas resembradas se sellaron con Vinilpel y se colocaron en condiciones asépticas a temperatura del laboratorio. Los tratamientos se revisaron diariamente para registrar: coloración de las cepas, tipo, aspecto y crecimiento del micelio. A cada aislamiento se le determinó el tamaño de las conidias comparando su dimensión con la escala de un ocular micrométrico previamente calibrado; se midió el largo y ancho de 100 conidias por tratamiento. También se realizó

un microcultivo por aislamiento para observar de manera inalterada al microscopio las características morfológicas de las estructuras del hongo. Se empleó un diseño completamente al azar, donde la unidad experimental estuvo conformada por una caja de Petri con 10 repeticiones, registrándose el crecimiento micelial en cada uno de los tratamientos. Para las anteriores variables se realizó el análisis de varianza y las pruebas de Duncan y Tukey a nivel del 5% (Saldarriaga, 2006).

### Realización de los diagnósticos moleculares mediante PCR y uso de cebadores específicos

**Crecimiento del hongo:** Las cepas utilizadas para la caracterización morfológica se cultivaron en PDA-acidificado y sin arrastrar medio de cultivo, se transfirieron a un erlenmeyer de 250 mL con 40 mL de medio líquido Sabouraud, al cual se le adicionó 100 mg del antibiótico Enrofloxacin. Diariamente se observó para verificar crecimiento y pureza, descartando los aislamientos que no estuvieran completamente puros (Dyer y Kurt, 2000). Transcurridos 11-15 días a temperatura ambiente (26°C) en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) se procedió a coleccionar el hongo mediante la eliminación del medio líquido, y el enjuague del hongo con agua destilada estéril, seguido de un secado a temperatura ambiente en condiciones asépticas para ser almacenado en un refrigerador Harris® Asheville, N.C., U.S.A. a -70°C.

**Extracción del ADN y cuantificación:** La extracción del ADN se realizó siguiendo el método de Reader y Broda (1985), con modificaciones realizadas en el laboratorio de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB, descritas por Saldarriaga (2006).

La cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante espectrofotometría en un equipo Perkin Elmer, lambda UV/VIS spectrometer. Para la cuantificación se prepararon diluciones 2:1000 en buffer TE a partir de las muestras de ADN conservadas a 4°C. Como blanco se usó buffer TE. Realizada la cuantificación se prepararon diluciones a 100 ng/□L, del ADN de cada uno de los aislamientos.

**PCR diagnóstica:** Para el diagnóstico de las especies de *Colletotrichum* se usaron los siguientes oligonucleótidos; CgInt: 5'GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG3' para la especie *Colletotrichum gloeosporioides*, y para la especie *Colletotrichum acutatum* CaInt-2: 5' GGC GCC GGCCCCGTCACGGGGG3'; cada uno estos oligonucleótidos se usó con el oligonucleótido inespecífico ITS-4: 5'TCC TCCGCTTATTGATATGC3' (Adaskaveg y Hartin, 1997). Las reacciones se hicieron de la siguiente manera: 2.5 □L; de

buffer de PCR (Invitrogen) 10X (50 mM KCl y 10 mM Tris-HCl, pH 8.5); 1.5 □L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 0.5 □L (10 mM) de los nucleótidos, dATP, dCTP, dGTP y dTTP (promega); 0.7 □L (25 picomolar) de cada uno de los oligonucleótidos CgInt ó Caint y ITS4; 1 □L (100 ng) de ADN; 0.125 □L (2.0 unidades) de taq polimerasa (promega), todo llevado a un volumen final de 25 □L (el volumen se completo con agua desionizada estéril). Se utilizó un control negativo para PCR consistente en la mezcla de los reactivos, pero sin adicionarles el ADN. También se usaron los respectivos controles positivos para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer 9600), con una temperatura inicial de 94°C por 1 min., seguido de 34 ciclos así: 94°C por 1 min.; 59°C por 2 min. y 72°C por 2 min., seguidos por un ciclo de extensión final de 5 min. a 72°C para *C. gloeosporioides*. Para *C. acutatum* las condiciones fueron: una temperatura inicial de 94°C por 1 min., seguido de 34 ciclos así: 94°C por 1 min.; 61°C por 2 min. y 72°C por 2 min., seguidos por un ciclo de extensión final de 5 min. a 72°C.

La electroforesis se realizó a 70 V durante 1 h y 30 min. en gel de agarosa al 0.8% con bromuro de Etidio (10 mg/mL). Los productos de las reacciones se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta.

## Resultados y discusión

### Elaboración del cepario: codificación, aislamiento y conservación de las cepas de *Colletotrichum*

Se conformó un cepario de 52 aislamientos de *Colletotrichum*, de los cuales, 25 provenían de frutos de tomate de árbol, 11 de frutos de manzana, 14 de tallos de mora y dos (2) cepas controles positivos para *C. gloeosporioides*.

Todas las cepas el hongo crecieron bien en el medio de cultivo PDA-acidificado, en donde el hongo cubrió entre el 80 y 100% de la superficie del medio de cultivo al cabo de 8 días bajo condiciones del laboratorio. También se observó buen crecimiento en el medio de conservación Sabouraud en tubos de ensayo, donde las cepas cubrieron completamente la superficie del medio al cabo de 4 a 6 días.

### Obtención de cultivos monospóricos, pruebas de patogenicidad y caracterización morfológica de los aislamientos

**Obtención de cultivos monospóricos:** A partir del cepario conformado y conservado durante 3 meses se reactivaron mediante resiembras en el medio Sabouraud un total de 41 aislamientos; se presentaron 9 casos en los

que el hongo no creció, y 7 casos en los que el hongo creció asociado a una bacteria, del género *Pseudomonas*. Estudios llevados a cabo por **Botero** (2001) y **Parbery y Blakeman** (1978), registran la existencia de cepas de *Pseudomonas* asociadas a *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. musae* y *C. dematium* los cuales poseen sustancias quelantes que pueden estimular la germinación y formación de apresorios del hongo favoreciendo los procesos de infección. De todas las cepas reactivadas se obtuvieron los cultivos monospóricos que se conservaron y emplearon en las pruebas de patogenicidad y en los estudios de caracterización y diagnóstico molecular.

**Pruebas de patogenicidad:** Se realizaron aplicando los postulados de Koch a los 41 aislamientos, de los cuales 20 provenían de tomate de árbol, 7 de manzana y 14 de mora. Un total de 28 aislamientos presentaron capacidad de inducir síntomas de la enfermedad en su respectivo hospedante, de estos 18 correspondieron a tomate de árbol, 6 a manzana y 4 a mora.

En los frutos de tomate de árbol, el periodo de incubación del hongo se manifestó después de 7 a 10 días de la inoculación (promedio 8.5 días). Los primeros síntomas consistieron en pequeñas manchas de aproximadamente 1.5mm de diámetro, redondeadas de color castaño oscuro, levemente deprimidas. El periodo de latencia se observó después de 4 a 6 días de detectados los primeros síntomas, es decir, entre 11 y 16 días (promedio 13.5 días); resultados que concuerdan con los estudios de patogenicidad del agente causante de la Antracnosis del tomate de árbol llevados a cabo por **Aranzazu y Rondón** (1999) y **Navarro y Puerta** (1978).

En los frutos de manzana el periodo de incubación del hongo osciló entre 6 y 8 días (promedio 7 días); los síntomas se manifestaron mediante lesiones de color castaño oscuro a negras, redondeadas, inicialmente sin depresión. El periodo de latencia se observó transcurridos 2 a 3 días de detectados los primeros síntomas, es decir entre 8 y 11 días (promedio 9.5 días) después de la inoculación. La esporulación se observó en acérvulos, con abundantes masas de conidias distribuidas en la lesión. A medida que las lesiones aumentaban de tamaño el centro de estas se fue colapsando, tornándose deprimidas en algunos aislamientos, síntomas que concuerdan con los descritos por **Salazar, Castaño-Zapata y Castaño** (1997) y **Latham y William** (1983). Los frutos empleados como controles permanecieron sanos.

En tomate de árbol, los diámetros de las lesiones fluctuaron entre 3.93 cm y 11.76 cm, lo cual muestra un amplio rango de variación. Al realizar la prueba de Duncan al 5%

se conformaron 13 grupos; siete de los cuales estaban compuestos por un solo aislamiento, y seis por más de uno, con escaso traslape (Tabla 1), con variación altamente significativa. Estas diferencias no se pueden atribuir separadamente al patógeno o al hospedante, pero si a una interacción entre ambos. Teniendo en cuenta que los frutos inoculados no provenían de una población uniforme genéticamente, los hospedantes pueden responder de manera diferente a la presencia del hongo; lo cual concuerda con los trabajos desarrollados por **Romero** (1999).

En la Tabla 1, se observa que los aislamientos ARLLT-1, AEPT-3, ARLLT-3, CMTUT-1 y AETT-1, que presentaron los mayores tamaños de lesiones, estaban estrechamente asociados a la bacteria del género *Pseudomonas*, que posiblemente sea un factor de patogenicidad adicional al del hongo.

En manzana también se presentó una variación altamente significativa en los tamaños de las lesiones en los frutos, pero hubo un mayor traslape entre los tratamientos (Tabla 2). Los tamaños de las lesiones fluctuaron entre 3.25 cm y 5.17 cm.

En mora, los aislamientos que produjeron los síntomas de la enfermedad se relacionan en la Tabla 3.

El periodo de incubación osciló entre 13 a 20 días (promedio 16.5 días); los síntomas se manifestaron mediante una lesión de color azul-violeta intenso, con bordes definidos que progresaron hasta rodear y cubrir el tallo. El periodo de latencia se observó entre 17 y 28 días (promedio 22.5 días). Entre 50 y 75 días de la inoculación se empezó a manifestar clorosis, y a los 80 a 90 días las ramas murieron. Estos síntomas concuerdan con los descritos por **Forero de La-Rotta, Ávila y González** (2002) y **Tamayo** (2001), para el patógeno causante de la Antracnosis de la mora de Castilla.

En esta investigación las plantas de mora inoculadas estuvieron sometidas a un ambiente en invernadero con temperaturas entre 12 y 28°C, y una humedad relativa alrededor del 78%; estas condiciones no corresponden estrictamente con las mencionadas por **Forero de La-Rotta, Ávila y González** (2002), como óptimas para el desarrollo de la enfermedad en mora. **González et al.** (2003), encontraron un mayor avance y severidad de la enfermedad en los tejidos más suculentos. **Bailey y Jeger** (1992), mencionan que la variabilidad en el periodo de latencia del hongo representa una adaptación importante a las condiciones de la fisiología del tejido del hospedante y a las condiciones climatológicas durante el ciclo del cultivo. **Botero** (2001), referencia que las diferencias en la patogenicidad

**Tabla 1.** Diámetro (cm.) de las lesiones de Antracnosis en frutos de tomate de árbol a los 22 días de la inoculación.

Código del aislamiento	Departamento	Municipio	Localidad	a.s.n.m	Diámetro promedio de las lesiones (cm)
CMTT-1	Caldas	Manizales	Tesorito	2350	11.76 a
ARLLT-1**	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	2120	9.41 b
AEPT-3**	Antioquia	Entrerriós	Pío XII	2435	6.84 c
ARLLT-3**	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	2120	6.54 d
CMTUT-1**	Caldas	Manizales	Tesorito-Univ	2300	5.90 e
AETT-1**	Antioquia	Entrerriós	Tesorero	2365	5.76 f
AETT-2	Antioquia	Entrerriós	Tesorero	2370	5.75 f
AEPT-1	Antioquia	Entrerriós	Pío XII	2460	5.57 g
AEPT-2**	Antioquia	Entrerriós	Pío XII	2435	5.51 gh
ASRLmT-2	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	2420	5.41 h
ASRTT-1	Antioquia	Santa Rosa	Teresitas	2510	5.26 i
ASRBT-2	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	2550	5.23 i
ASROT-2	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	2440	4.83 j
AECET-1	Antioquia	Entrerriós	Cuatroesquinas	2400	4.73 j
ASRBT-1	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	2550	4.59 k
ASRLmT-1**	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	2420	4.15 l
ASROT-1	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	2440	4.06 l
ASRMT-1	Antioquia	Santa Rosa	Malambo	2420	3.93 i

\* Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa al nivel del 5%.

\*\* Aislamientos fuertemente asociados a la bacteria.

**Tabla 2.** Diámetro (cm.) de las lesiones de Antracnosis en frutos de manzana a los 22 días de la inoculación.

Código del aislamiento	Departamento	Municipio	Localidad	a.s.n.m	Diámetro promedio de las lesiones (cm)
CRSEoMa-2	Caldas	Río Sucio	El Oro	2.150	5.17a
CVMLfMa-4	Caldas	Villa María	La Florida	2.100	4.91 ab
CMChMa-1	Caldas	Manizales	Chulca	2.400	4.77 ab
CVMLfMa-3	Caldas	Villa María	La Florida	2.100	4.50 bc
CVMVMa-1	Caldas	Villa María	Valles	2.100	4.15 c
CRSEoMa-1	Caldas	Río Sucio	El Oro	2.150	3.25 d

de una cepa puede ser consecuencia de las interacciones del medio ambiente, la secreción de enzimas del hongo y el genotipo del hospedante.

#### Caracterización morfológica de los aislamientos:

Siguiendo la metodología planteada se registraron las siguientes características a un total de 33 aislamientos:

**Coloración de las cepas:** A los 10 días de la siembra en PDA-acidificado las cepas del hongo a temperatura ambiente (17°C) en el laboratorio, exhibieron coloraciones variables entre y dentro de los tratamientos (Figura 1A). Un 36% de los aislamientos presentaron coloración gris-naranja, un 24% amarillo-naranja, un 12% naranja-blanco, un 9% naranja, un 9% blanco, y un 9% otras coloraciones;

**Tabla 3.** Aislamientos con capacidad de inducir síntomas de la enfermedad en mora.

Código del aislamiento	Departamento	Municipio	Vereda o localidad	a.s.n.m.
AGScM-1	Antioquia	Guarne	Santa Clara	2310
AMSEM-1	Antioquia	Medellín	Santa Elena	2520
AMSEM-2	Antioquia	Medellín	Santa Elena	2520
AMSEM-6	Antioquia	Medellín	Santa Elena	2520

todas las coloraciones mostraron cambios con el transcurso del tiempo. La variabilidad en la coloración de los aislamientos del hongo es considerada normal y ha sido registrada por **Vinnere (2004)**, **Wharton y Diéguez (2004)** y **Freeman, Katan y Shabi (1998)**, quienes sugieren tener precaución cuando se usa esta característica para separar especies.

**Tipo y aspecto del micelio:** Cerca del 70% de las cepas presentaron un crecimiento ralo-superficial del micelio; otras cepas presentaron crecimiento ralo-superficial con agregados miceliales de aspecto grumoso o agregados de micelio denso de aspecto algodonoso, distribuidos irregularmente por toda la cepa o en ocasiones formando anillos. Al microscopio se observó un micelio hialino, septado, con inclusiones citoplasmáticas y variaciones a medida que la cepa envejecía. Entre los 5-7 días de establecidos los microcultivos, los extremos de las hifas se tornaron de aspecto granuloso e iniciaron la formación de espirales que luego se ensancharon y aplanaron para originar los apresorios al cabo de 48 a 72 h. Los apresorios recién formados se observaron hialinos y después de 24 a 72 h se tornaron de color castaño a castaño oscuro (Figura 1B). En los microcultivos crecieron dos grupos de hifas; las primeras observaciones corresponden a hifas largas (Figura 1C), que colonizaban el medio de cultivo extendiéndose en él para formar conidióforos simples y apresorios; las siguientes observaciones conformadas por hifas más cortas (Figura 1D) especializadas en producir masivamente conidias, este grupo de hifas predominaba en los aislamientos con mayor aptitud para la esporulación. Entre los 4 y 7 días se observó la formación de estructuras redondeadas similares a vesículas en posición intercalar o en los extremos de las hifas de algunos aislamientos; estas estructuras conservaron su forma durante 24 a 36 h, y luego empezaron a perderla (Figura 1E, F).

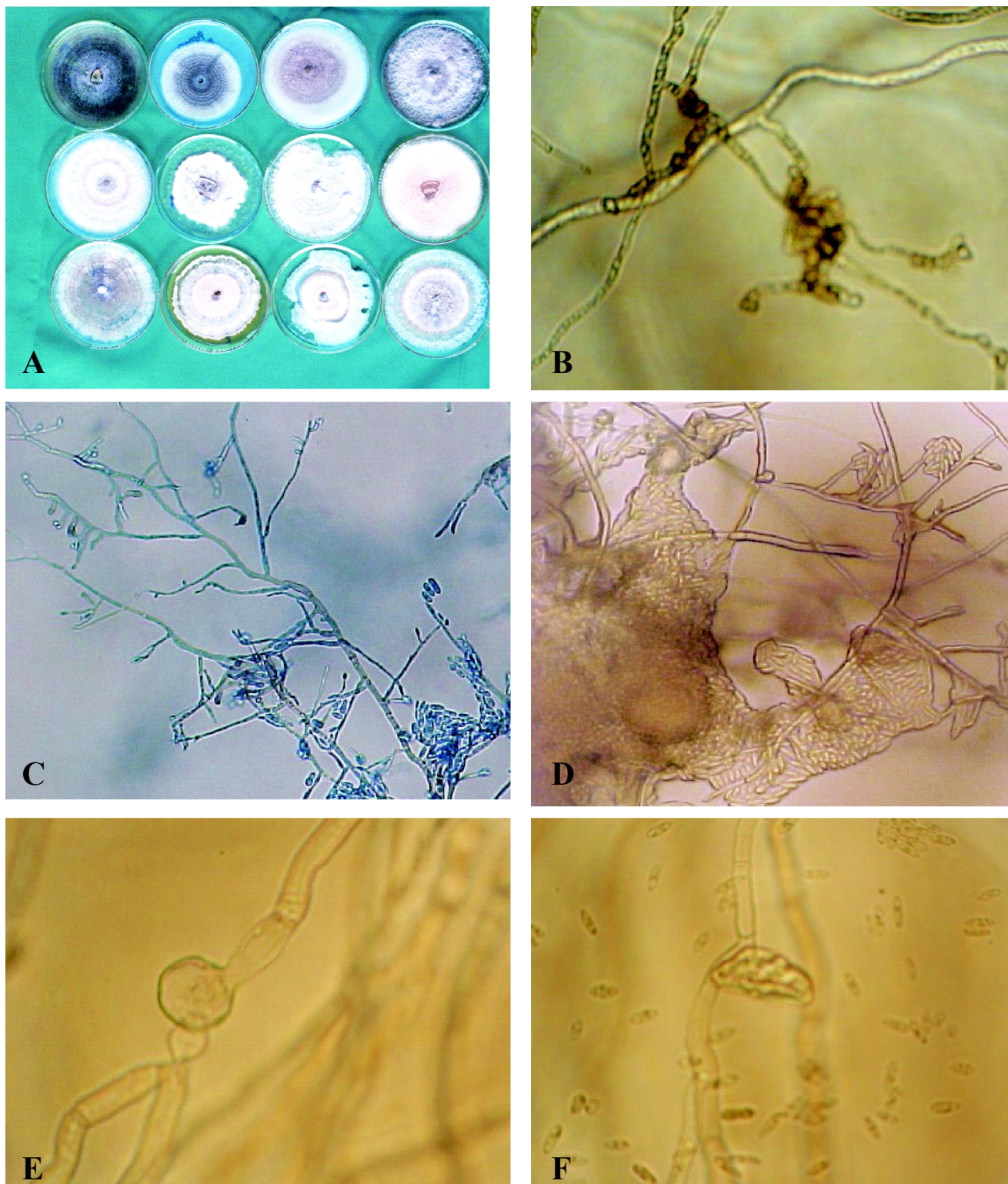
**Tasa de crecimiento:** La más alta tasa de crecimiento se presentó en el aislamiento AEPT-3, con 0.318 cm./día y la menor tasa en el aislamiento AMSEM-2, con 0.114 cm./día. El análisis de varianza registró una diferencia altamente significativa entre los diferentes aislamientos (Tabla 4).

Estas tasas de crecimiento se obtuvieron a 17°C, y no concuerdan con las reportadas por **Adaskaveg y Hartin (1997)**, para aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* mantenidos a 25 y 30°C, respectivamente. En este estudio las tasas de crecimiento fueron inferiores a las obtenidas por los mencionados investigadores. Sin embargo, **Freeman, Katan y Shabi (1998)**, encontraron tasas de crecimiento de *C. gloeosporioides* con crecimiento tan lento que no difirió de las tasas de crecimiento de *C. acutatum*.

**Tamaño de las conidias:** El largo de las conidias fluctuó entre 8.73 y 15.17µm. Se registraron diferencias altamente significativas para esta variable (Tabla 5). Con la aplicación de la prueba de Duncan al 5% se conformaron 18 grupos para esta variable, el mayor de ellos conformado por 15 aislamientos y el menor con un solo aislamiento. Entre los valores de largo de conidias comprendidos entre 10.6µm y 11.93µm, se concentra un traslape de casi todos los aislamientos, lo cual dificulta la separación o diferenciación de estos mediante la utilización de esta variable en este rango.

El ancho de las conidias fluctuó entre 3.52 y 5.09µm, con diferencias altamente significativas (Tabla 6). Con la prueba de Duncan a nivel del 5%, se conformaron 16 grupos ampliamente traslapados, dificultándose aún más la diferenciación de los aislamientos utilizando esta variable.

**Forma de las conidias:** Se presentaron diversas formas de conidias tanto entre las diferentes cepas como dentro de una misma cepa. Las principales formas encontradas, considerando las definiciones de **Ulloa y Hanlin (2001)**, para los tipos de conidias fueron: elipsoides, ligeramente fusiformes, ovoides, oblongas y elipsoides ligeramente constrictas. Según **Freeman, Katan y Shabi (1998)** y **Bailey y Jeger (1992)**, la morfología de las conidias así como el tamaño de las mismas no son elementos satisfactorios para distinguir las especies de *Colletotrichum*, debido a que la estabilidad de los rasgos morfológicos es afectada por factores ambientales, además de la existencia de formas intermedias en la morfología conidial y en el tamaño, lo cual conlleva a que la cepa pueda ser identificada como una u



**Figura 1.** A. Morfología y coloración de las cepas de hongos a los 10 días de sembradas en PDA-acidificado. B. Apresorios en proceso de melanización en microcultivo (40x). C. Hifas largas (40x). D. Hifas cortas (40x). E. Estructura similar a una vesícula a las 126h en microcultivo. F. Estructura similar a una vesícula a las 150h en microcultivo.



**Tabla 4.** Análisis de varianza (ANOVA) para la variable tasa de crecimiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Tratamientos	32	1.22270700	0.03820959	2.29	0.0002
Error	297	4.95265604	0.01667561		
Total	329	6.17536304			

R-Cuadrado = 0.197998 CV = 53.90517 R. MSE = 0.12913408 Promedio = 0.23955788

**Tabla 5.** Análisis de varianza (ANOVA) para la variable largo de conidias.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Tratamientos	32	8156.40827273	254.88775852	91.85	0.0001
Error	3267	9066.05180000	2.77503881		
Total	3299	17222.46007273			

R- cuadrado = 0.473591 C.V. = 14.66037 R MSE = 1.66584477 Promedio = 11.36290909

**Tabla 6.** Análisis de varianza (ANOVA) para la variable ancho de conidias.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Tratamientos	32	480.07469697	15.00233428	49.79	0.0001
Error	3267	984.33020000	0.30129483		
Total	3299	1464.40489697			

R-cuadrado = 0.327829 C.V. = 11.711111 R. MSE = 0.54890329 Promedio = 4.68703030

otra especie, dependiendo de los criterios individuales del identificador. También la falta de estandarización de los protocolos y condiciones de trabajo entre los diferentes investigadores, así como la inexistencia de convenciones internacionalmente aceptadas, crean controversias y confusiones que dificultan y producen incertidumbre en las identificaciones de los aislamientos (Bailey y Jeger, 1992).

#### Realización de los diagnósticos moleculares mediante PCR y uso de cebadores específicos

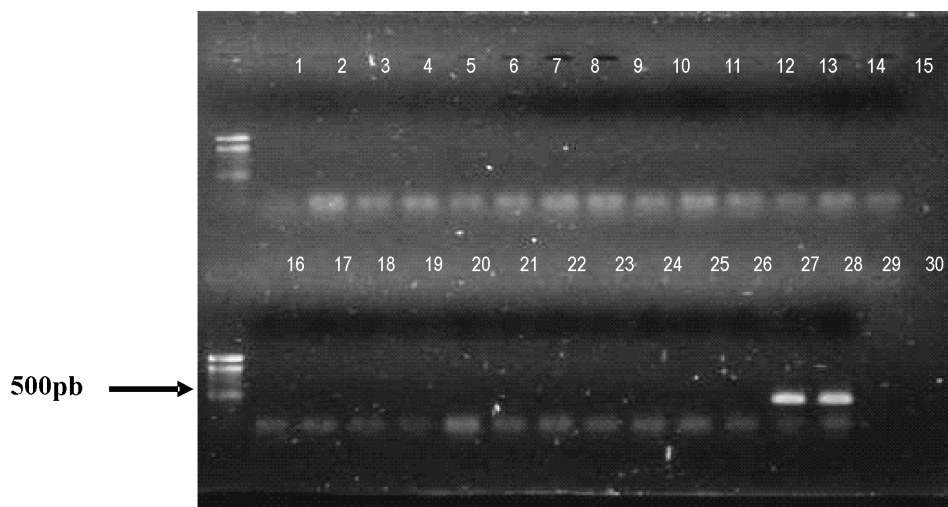
**Crecimiento del hongo:** considerando los aspectos planteados en la metodología se seleccionaron y cultivaron 27 aislamientos del hongo, los cuales presentaron buen crecimiento y pureza en el medio líquido.

**Extracción y cuantificación del ADN:** Con este método se obtuvieron rendimientos entre 300 y 17.750 ng/ $\mu$ L de ADN, concentraciones que variaron según el aislamiento del hongo. A partir de estas concentraciones se realizaron

las diluciones a 100 ng/mL en cada una de las muestras de ADN de los aislamientos.

**PCR diagnóstica:** Mediante la aplicación del protocolo descrito en la metodología y empleando los oligonucleóticos CgInt-ITS4, específicos para *C. gloeosporioides*, solo se logró la amplificación de las cepas controles para esta especie del hongo (Figura 2), lo cual sugiere que los aislamientos del hongo provenientes de los cultivos de tomate de árbol, mora y manzano no corresponden a esta especie, dado que se comprobó que los ADN del cepario sometido a la prueba no habían sufrido degradación y amplificaron perfectamente con los oligonucleótidos universales ITS1-ITS4.

Considerando el resultado y con la revisión de literatura sobre los caracteres morfológicos de las especies de *Colletotrichum*, así como los reportes de estas en manzana, tomate de árbol y mora, además de los registros sobre el uso de oligonucleótidos en la diferenciación de especies de *Colletotrichum* frutales, se solicitó sintetizar el oligonucleótido CaInt-2 referenciado en los trabajos de

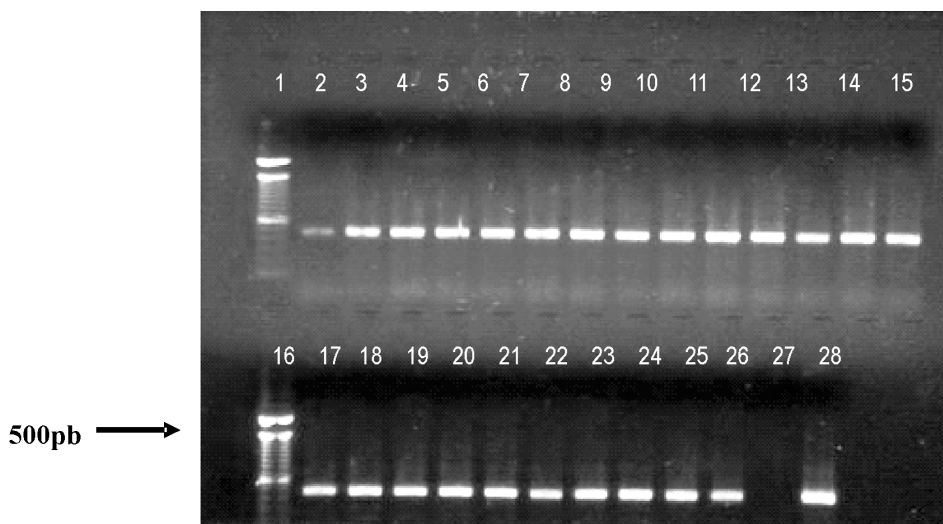


**Figura 2.** PCR diagnóstica para *C. gloeosporioides*. Productos amplificados con los oligonucleótidos CgInt-ITS4. Carriles 1 y 16, marcadores de peso molecular 100pb ladder-CIB. Carriles 2-27, ADN de los aislamientos de *Colletotrichum*. Carriles 28 y 29, controles positivos para *C. gloeosporioides*. Carril 30, control negativo para la PCR.

**Adaskaveg y Hartin (1997)**, como específico y útil para el diagnóstico de *Colletotrichum acutatum*; con este oligonucleótido y aplicando el protocolo descrito en la metodología se logró la amplificación de todos los ADN de los aislamientos, incluyendo el ADN de un aislamiento control positivo de *C. acutatum* (CA-2 cepa 1384 del C.I. Tibaitatá, CORPOICA) proveniente de cáliz persistente de naranja Valencia (Figura 3).

*C. acutatum* se reporta como patógeno causante de Antracnosis en tomate de árbol y en manzana; pero en mora no se encuentran registros de esta especie causando enfermedad en dicho cultivo.

Tradicionalmente *C. acutatum* era diferenciado de *C. gloeosporioides* principalmente por la forma de las conidias, el color de las cepas, ocurrencia del teleomorfo y



**Figura 3.** Productos amplificados con los oligonucleótidos CaInt-ITS4. Carriles 1 y 16, marcadores de peso molecular 100pb ladder-CIB. Carriles 2-15 y 17-26, ADN de los aislamientos de *Colletotrichum*. Carril 27, control negativo para la PCR. Carril 28, control positivo para *C. acutatum*.

sensibilidad diferencial a benomil; sin embargo, después del año 2004, con los trabajos realizados por **Vinnere** (2004), **Wharton y Diéguez** (2004) y **OEPP/EPO** (2004), estos aspectos son reevaluados. Los mencionados trabajos referencian que *C. acutatum* es una especie poseedora de una amplia diversidad genética y una gran variabilidad en sus caracteres morfológicos y fisiológicos.

La presencia de *C. acutatum* en estos frutales crea la necesidad de adelantar estudios para conocer el comportamiento del patógeno y su contribución a las pérdidas registradas por la Antracnosis causada por *C. gloeosporioides*, e igualmente hace necesario investigar sobre la composición poblacional de *Colletotrichum*, patogenicidad y prevalencia de las especies, fuentes de inóculo y ciclos de la enfermedad bajo condiciones del trópico, entre otros aspectos.

## Conclusiones

En este trabajo se comprobó la gran variabilidad existente dentro y entre los tratamientos en las características morfológicas de las cepas, especialmente el color, el aspecto y tipo de micelio, lo cual hace que estos caracteres no sean confiables para la diferenciación de las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

La morfología conidial (tamaño y forma), también presentó amplia variación entre y dentro de los aislamientos, dificultando su diferenciación, además de la inestabilidad de los rasgos fenotípicos de las conidias durante el transcurso del tiempo.

Mediante la aplicación de PCR en el diagnóstico de patógenos vegetales se pudo detectar la presencia de *C. acutatum* como agente causante de Antracnosis en frutos de tomate de árbol y manzana, y produciendo lesiones y muerte en ramas de mora.

Los protocolos de diagnóstico molecular desarrollados y empleados durante la ejecución de este trabajo permitieron diferenciar las especies de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* aisladas de frutos de tomate de árbol, manzana y tallos de mora, y se pueden considerar un aporte valioso para continuar los estudios sobre el complejo *Colletotrichum* en los frutales de clima frío moderado.

## Bibliografía

**Adaskaveg, J. E. and Hartin, R.J.** 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. En: *Phytopathology*. 87: 979-987.

**Aranzazu, F. y Rondón, G.** 1999. Manejo productivo del cultivo del tomate de árbol y de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), Penz. & Sacc.). Santafé de Bogotá: Boletín Divulgativo CORPOICA-PRONATTA. p. 9-18.

**Ávila, W.; González, R.; F. De La Rotta, M.C. y Vargas, A.** 2003. Penetración, infección y sitios de ataque del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en plantas de mora de Castilla. p. 4. En: XXIV Congreso Nacional de Fitopatología (2003: Armenia. Colombia). Memorias. Armenia: Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines.

**Bailey, J. A. and Jeger, M. J.** 1992. *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. Wallingford UK : CAB International. 387p.

**Botero, M.J.; Franco, G.; Castaño-Zapata, J. y Ramírez, M.C.** 2003. Enfermedades de poscosecha en lulo (*Solanum quitoense*), mora (*Rubus glaucus*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). p. 59. En: XXIV Congreso Nacional de Fitopatología (2003: Armenia. Colombia). Memorias. Armenia: Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines.

**Botero, M. J.** 2001. Interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., agente causal de la Antracnosis en tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* (Cav.) Sendt.). Manizales. 184p. Tesis de Magíster en Fitopatología. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

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

**CORPOICA.** 1998. Programa nacional de manejo integrado de plagas-MIP. Documento de trabajo. Bogotá: Centro de Investigación Tibaitatá. 6p.

**CORPOICA.** 1999. Estudios biológicos y epidemiológicos de la Antracnosis del tomate de árbol y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia : Informe Técnico Final. PRONATTA-CORPOICA. Santafé de Bogotá, D.C. 147p.

**Dyer, T. and Kurt, L.** 2000. Contamination, error, and non-specific molecular tools. En: *Phytopathology*. 90(6): 565-567.

**Forero De La Rotta, M.C.; Ávila, W. y González, R.** 2002. Estudio sobre "Antracnosis" en mora de Castilla. p. 220-228. En: IV Seminario Frutales de Clima Frío Moderado (2002: Medellín. Colombia). Memorias. Medellín: CORPOICA, CDTF, UPB.

**Freeman, S.; Katan, T. and Shabi, E.** 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. En: *Plant Disease*. 82(6): 596-604.

**González, R.; Ávila, W.; F De La Rotta, M.C. y Vargas, A.** 2003. Estudios sobre la severidad y avance del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* agente causante de la Antracnosis en mora de Castilla. p. 5. En: XXIV Congreso Nacional de Fitopatología (2003: Armenia, Colombia). Memorias. Armenia: Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines.

**Herrera, A.** 1985. Manual de medios de cultivo. La Habana: Editorial Científico-técnica. p. 155-156.

- Latham, A.J. and William, J.C.** 1983. Cultural characteristics and pathogenicity of *Glomerella cingulata* isolates from apples in Alabama. En: Plant Disease 67: 1065-1068.
- Martínez-Culebras, P.; Barrio, E.; García, M.D. and Querol, A.** 2000. Identification of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. En: FEMS Microbiology Letters 189: 97-101.
- Navarro, R. A. y Puerta, O. D.** 1978. Proceso de infección por *Gloeosporium* sp. en frutos de tomate de árbol, *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. En: Ascolfi Informa. 4(3): 6-7.
- Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes / European and Mediterranean Plant Protection Organization OEPP/EPPO.** 2004. Protocolos de diagnostic pour les organismes réglementés. *Glomerella acutata*. Bulletin 34: 193-199.
- Osorio, J. A.** 2003. Cómo pensar y desarrollar la investigación agrícola en la Corpoica del futuro: Horizonte 2003-2007. Documento Corpoica, C.I. Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca. p. 6.
- Parbery, D.G. y Blakeman, J. P.** 1978. Effect of chemical substances associated with the surfaces of plant leaves on appressorium formation by *Colletotrichum acutatum*. En: Transactions of the British Mycological Society. p. 153-159.
- Reader, U. and Broda, P.** 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. En: Letters in Applied Microbiology. 1: 17-20.
- Romero, S. E.** 1999. Caracterización morfológica, molecular y variabilidad patogénica del agente causal de la Antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* en tomate de árbol en Colombia. Santafé de Bogotá. 107p. Tesis Magíster en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Área de fitopatología.
- Salazar, H.; Castaño-Zapata, J. y Castaño, O.** 1997. Principales enfermedades y plagas asociadas a cultivos de manzano y durazno en Caldas. Manizales: Artes Gráficas Tizan Ltda. p. 12-13.
- Saldarriaga, A.** 2006. Caracterización del agente causante de la Antracnosis en tomate de árbol, manzana y mora. Manizales. 191p. Tesis de Magíster en Fitopatología. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Schilder, A.** 2003. Optimum timing and use of strobilurin fungicides for disease control in strawberries. Department of Plant Pathology. 164 Plant Biology Building, Michigan State University. Disponible en Internet: www.schilder@msu.edu.
- Tamayo, P.** 2001. Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulo en Colombia. Boletín Técnico 12. Rionegro (Antioquia): Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). p. 21-23.
- Ulloa, M. and Hanlin, T.** 2001. Illustrated dictionary of mycology. St. Paul, Minnesota: APS Press. p. 87, 108, 130, 164, 266.
- Vinnere, O.** 2004. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala-Sweden. 42h. Thesis Doctor of Philosophy. Uppsala University.
- Wharton, P. S. and Diéguez-Uribeondo, J.** 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. En: Anales del Jardín Botánico de Madrid. 61(1): 3-22.

Recibido: 20 de marzo de 2007

Aceptado para su publicación: 7 de julio de 2008