

PRESENCIA DE *Colletotrichum acutatum* Y *Colletotrichum gloeosporioides* EN HELECHO HOJA DE CUERO, LIMÓN CRIOLLO, PAPAYA, CARAMBOLA Y MANGO EN COSTA RICA Y FLORIDA (ESTADOS UNIDOS)¹

Marcia Barquero Quirós*, Natalia A. Peres**, Luis Felipe Arauz^{2/***}

Palabras clave: Antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, mango, papaya, carambola, lima, helecho hoja de cuero.

Keywords: Anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, mango, papaya, starfruit, lime, leatherleaf fern.

Recibido: 09/08/12

Aceptado: 06/12/12

RESUMEN

La antracnosis es una enfermedad causada por varias especies del género *Colletotrichum* en diferentes hospederos. *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* son especies morfológicamente similares, que pueden causar síntomas similares en el mismo hospedero. Se colectaron 220 aislamientos de *Colletotrichum* de muestras con síntomas típicos de antracnosis en helecho hoja de cuero (*Rumohra adiantiformis*), limón criollo (*Citrus aurantifolia*), carambola (*Averrhoa carambola*), papaya (*Carica papaya*) y mango (*Mangifera indica*) en Costa Rica y Florida, Estados Unidos. Los aislamientos se caracterizaron por morfología de colonia, sensibilidad al benomil, y PCR con los iniciadores específicos para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* CaInt2 y Cg/fInt1, respectivamente; también se analizó la morfología de las colonias de ambas especies. De los 85 aislamientos obtenidos de mango, todos los aislamientos de Florida fueron identificados como *C. acutatum*, mientras que todos los aislamientos de Costa Rica fueron *C. gloeosporioides*. De los 60 aislamientos de carambola, 3 provenientes de Costa Rica fueron *C. acutatum* (primer informe) y el resto fueron *C. gloeosporioides*. Todos los

ABSTRACT

Presence of *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* on leatherleaf fern, key lime, papaya, star fruit and mango in Costa Rica and Florida (United States). Anthracnose is a disease caused by several species of the genus *Colletotrichum* on different hosts. *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* are 2 morphologically similar species that can cause similar disease symptoms on the same host. A total of 220 isolates of *Colletotrichum* species were collected from typical anthracnose lesions on leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis*), Key lime (*Citrus aurantifolia*), starfruit (*Averrhoa carambola*), papaya (*Carica papaya*) and mango (*Mangifera indica*) in Costa Rica and Florida. Isolates were characterized by colony morphology, benomyl sensitivity and PCR with specific primers for *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* CaInt2 and Cg/fInt1, respectively. Of the 85 isolates obtained from mango, all 33 isolates from Florida were identified as *C. acutatum*, whereas all isolates from Costa Rica were *C. gloeosporioides*. Out of 60 isolates obtained from starfruit, 3 isolates from Costa Rica were

1/ Parte de la tesis de maestría de la primera autora.
2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: felipe.arauz@ucr.ac.cr
* Departamento de Microbiología y Genética Molecular, Universidad de Salamanca, España.

** Gulf Coast Research and Education Center, University of Florida, Wimauma, FL, USA.
*** Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

aislamientos de helecho hoja de cuero (25 aislamientos) y de limón criollo (25 aislamientos) se identificaron como *C. acutatum*. Los demás aislamientos de carambola y mango así como todos los aislamientos de papaya, se identificaron como *C. gloeosporioides*. No se encontró diferenciación de síntomas entre ambas especies sobre los hospederos donde se encontraron.

INTRODUCCIÓN

Colletotrichum acutatum J.H Simmonds es un patógeno que afecta a numerosos hospederos en climas tropicales, subtropicales y templados (Bernstein et ál. 1995). Es el agente causal de la antracnosis en varios cultivos y de la caída prematura del fruto (PFD) en cítricos (Agostini et ál. 1992). El uso de técnicas moleculares y los avances en estudios de taxonomía y epidemiología permitieron la identificación de *C. acutatum* como causante de antracnosis en varios casos en los que se consideraba a *C. gloeosporioides* como el agente causal (Freeman et ál. 2001).

Existen pocos estudios sobre la identificación a nivel de especie del agente causal de la antracnosis en Costa Rica; en frutales como papaya (*Carica papaya*), mango (*Mangifera indica*) y aguacate (*Persea americana*), la antracnosis poscosecha generalmente se ha relacionado a *C. gloeosporioides* como el agente causal de la enfermedad (Arauz 2000); sin embargo, nuevos informes en otras partes del mundo han identificado a *C. acutatum* asociado con la antracnosis en estos frutales, entre ellos en mango en Florida (Peres et ál. 2005, Rivera et ál. 2006).

Freeman et ál. (2001) y Sreenivasaprasad y Talhinhos (2005); encontraron diferencias entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* mediante técnicas moleculares y criterios morfológicos. Las principales características morfológicas, altamente variables y subjetivas, utilizadas para

C. acutatum (first report) and the rest were *C. gloeosporioides*. All isolates from leatherleaf fern (25 isolates) and Key lime (25 isolates) were identified as *C. acutatum*. All remaining isolates from startfruit and mango, as well as all isolates from papaya, were *C. gloeosporioides*. There was no symptom difference between both *Colletotrichum* species on those hosts were both species were found.

distinguir *C. acutatum* de *C. gloeosporioides* y otras especies de *Colletotrichum*, son la forma de los conidios, la baja tasa de crecimiento, el color de la colonia y la secreción de pigmentos rojos o rosados al medio de cultivo (aislamientos cromogénicos) (Lardner et ál. 1999).

Otro método utilizado para distinguir entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* es la prueba de sensibilidad a benomil; Peres et ál. (2004) encontraron una inhibición de un 80% en el crecimiento de aislamientos de *C. acutatum* en cultivo in vitro con concentraciones de benomil de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mientras que a esta misma concentración el crecimiento de *C. gloeosporioides* se inhibió totalmente. Asimismo encontraron aislamientos de *C. gloeosporioides* resistentes a benomil que no presentaron inhibición en su crecimiento.

Las herramientas moleculares son efectivas para distinguir entre las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Sreenivasaprasad et ál. (1996), Adaskaveg y Hartin (1997) y Schiller et ál. (2006), utilizaron exitosamente iniciadores específicos para *C. acutatum* (*CaInt1* o *CaInt2*) combinados con el iniciador universal ITS4 para la detección del patógeno.

Entre los pocos estudios relacionados con *C. acutatum* en Costa Rica, se identificó como *C. acutatum* al agente causal de la antracnosis en fresa y helecho hoja cuero (Schiller et ál. 2006) y de la caída prematura de los frutos en cítricos (Arce 2003), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El objetivo de este estudio fue identificar las especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en papaya, mango, carambola, helecho hoja de cuero y limón criollo en Costa Rica y Florida (USA), mediante la prueba de sensibilidad a benomil y mediante PCR con iniciadores específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de *Colletotrichum* spp., y mantenimiento de aislamientos

Se colectaron muestras con síntomas de antracnosis en diferentes sitios y cultivos de

Costa Rica y Florida durante el 2006, 2007 y 2008 (Cuadro 1, Figura 1), se trasladaron al laboratorio en bolsas plásticas y se almacenaron a 4°C. Al cabo de 24 o 48 h se realizaron los aislamientos y se tomaron fotografías de las lesiones.

Se realizaron aislamientos en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) acidificado, a partir de la zona de avance de la lesión o directamente de raspados de acérvulos. Los aislamientos se mantuvieron en crecimiento con oscuridad a 24°C, durante mínimo una semana; se realizaron cultivos monospóricos de cada aislamiento.

Cuadro 1. Cultivos, tejido analizado, número de aislamientos y lugar de procedencia de aislamientos de *Colletotrichum* spp., en Costa Rica.

Cultivo	Lugar de procedencia	Número de aislamientos por tejido analizado								Total
		Hojas o frondas	Pecíolos	Ramas o tallos	Flores o inflorescencias	Frutos inmaduros	Frutos maduros	Frutos maduros	Total	
Helecho hoja cuero	Cervantes (Región Central Oriental)	5	-	-	-	-	-	-	-	5
	Tejar (Región Central Oriental)	5	-	-	-	-	-	-	-	5
	Tres Ríos (Región Central Oriental)	5	-	-	-	-	-	-	-	5
	Fraijanes (Región Central Occidental)	10	-	-	-	-	-	-	-	10
Limón criollo	Guácimo (Región Atlántica)	3	-	1	0	0	0	0	-	4
	San Pedro (Región Central)	7	-	0	3	1	-	-	-	11
	Buenos Aires (Región Brunca)	8	-	0	2	0	-	-	-	10
	Ciudad Colón (Región Central Sur)	0	-	0	17	-	-	-	-	17
Mango	Liberia (Región Chorotega)	11	-	0	10	-	-	-	3	24
	Orotina (Región Central Occidental)	5	-	0	2	-	-	-	2	9
	Atenas (Región Central Occidental)	0	-	2	0	-	-	-	0	2
	Miami, Florida, Estados Unidos*	20	-	2	2	-	-	-	-	24
	Homestead, Florida, Estados Unidos*	9	-	-	-	-	-	-	-	9
	San Carlos (Región Huetar Norte)	-	3	-	-	5	7	-	-	15
Papaya	Los Chiles (Región Huetar Norte)	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	Guácimo (Región Atlántica)	-	2	-	-	0	4	-	-	6
	Guápiles (Región Atlántica)	-	1	-	-	1	2	-	-	4
	San Carlos (Región Huetar Norte)	-	-	-	-	1	3	-	-	4
Carambola	Los Chiles (Región Huetar Norte)	-	-	-	-	0	4	-	-	4
	Guácimo (Región Atlántica)	-	-	-	-	0	4	-	-	4
	Guápiles (Región Atlántica)	-	-	-	-	0	4	-	-	4
	Buenos Aires (Región Brunca)	-	-	-	-	2	6	-	-	8
	Ciudad Colón (Región Central Sur)	-	-	-	-	0	2	-	-	2
	Homestead, Florida, Estados Unidos*	-	-	-	-	3	8	-	-	11
	Tampa, Florida, Estados Unidos*	-	-	-	-	8	15	-	-	23
	Total									220

* Localidades muestreadas en Florida, Estados Unidos.



Fig. 1. Sitios muestreados para antracnosis en helecho hoja de cuero (*Rumohra adiantiformis*), limón criollo (*Citrus aurantifolia*), mango (*Mangifera indica*), papaya (*Carica papaya*) y carambola (*Averrhoa carambola*) en (A) Costa Rica y (B) Florida, Estados Unidos.

Prueba de sensibilidad a benomil

Del borde de la colonia de cada aislamiento monospórico se tomaron 4 cuadrados de 3 mm de lado; se transfirieron 2 secciones a platos Petri con PDA y los otros 2 a PDA con benomil ($1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Se realizaron 3 repeticiones y se incubaron durante una semana en oscuridad a 24°C . Se realizaron comparaciones visuales del crecimiento de la colonia para determinar la sensibilidad al benomil, según el crecimiento:

A: Tasa de crecimiento menor en medio PDA con benomil que en medio PDA

B: Tasa de crecimiento igual en medio PDA con benomil y en medio PDA

C: Ausencia de crecimiento en medio PDA con benomil

El caso A correspondería a *C. acutatum* sensible al benomil, el B a *C. gloeosporioides* resistente a benomil, y el C a *C. gloeosporioides* sensible a benomil.

Identificación por PCR con iniciadores específicos

Se tomó un trozo micelio de la zona de crecimiento de cada aislamiento monospórico y se puso a crecer en 50 ml de medio líquido Emmerson (4 g de extracto de levadura, 15 g de almidón soluble, 1 g de K_2HPO_4 y 0,5 g de MgSO_4 por litro) durante 3 días en agitación a 170 rpm y luego se filtró al vacío con papel Whatman número 3. Se dejó durante toda la noche en un evaporador centrifugal. El ADN de los hongos se extrajo por medio del método CTAB (Xiao et ál. 2004), que consiste en la utilización de un tampón de extracción a base de Hexadeciltrimetilbromuro de amonio (CTAB).

Para la detección de *C. acutatum* se utilizó el iniciador específico *CaInt2* (5'-GGG-GAAGCTCTCGCGG-3') (Sreenivasaprasad et ál. 1996) junto con el iniciador universal ITS4 (5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3') (White et ál. 1990). Para la detección de *C. gloeosporioides* se utilizó el iniciador específico *Cg/fInt1* (5'-GACCCTCCCGGCTCCCGCC-3')

(Ureña-Padilla et ál. 2001) junto con el iniciador universal ITS4.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 μ l con una concentración final de: 1X de Buffer de PCR Perkin Elmer, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP's, 1 μ M *CaInt2* o *Cg/fInt1*, 1 μ M ITS4 y 1 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, USA). En la reacción de PCR de *C. acutatum* además se añadió glicerol al 6%.

Para la PCR de *C. gloeosporioides* usó el siguiente programa: 94°C por 5 min para la desnaturalización del ADN y 26 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 2 min y 72°C por 2 min; luego 72°C por 10 min y finalmente 4°C. Los parámetros de temperatura para la PCR en el caso de *C. acutatum* fueron los mismos que para *C. gloeosporioides* pero con 32 ciclos (MacKenzie S.J. 2008. Comunicación personal). Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio incorporado y se visualizaron con luz ultravioleta (UV). Se utilizaron como positivos aislamientos de la colección del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Costa Rica de fresa y helecho hoja de cuero identificados previamente como *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* respectivamente.

Medición de colonias y conidios de *C. acutatum*

Se midió el diámetro de 5 colonias y la longitud de 10 conidios escogidos al azar de 3

aislamientos de mango (Mn10, Mn38 y Mn43) y 2 aislamientos de carambola (Carl y Car2) identificados todos como *C. acutatum*. Además, para fines comparativos, se midió el diámetro de colonias de *C. gloeosporioides* de carambola y mango.

RESULTADOS

Muestreo de *Colletotrichum* spp., y caracterización de colonias

Se obtuvieron aislamientos a partir de lesiones de antracnosis de diferentes tejidos de helecho hoja de cuero, limón criollo, mango, papaya y carambola (Cuadro 1). En limón criollo la lesión consistió en la necrosis de las hojas con producción de acérvulos sobre lesiones viejas (Figura 2A y 2B). En limón criollo también se observaron lesiones y acérvulos en inflorescencias y frutos. En carambola se definen claramente 2 tipos de lesiones en fruto: una mancha necrótica irregular y una necrosis en los vértices de la fruta; sobre ambas lesiones hay producción de acérvulos (Figura 2C y 2D). En helecho hoja de cuero la lesión consistió en la necrosis de las frondas de la planta (Figura 2E y 2F).

En mango, las hojas presentaron lesiones irregulares de gran tamaño en los márgenes de las hojas, zonas necróticas en las venas, o pequeñas lesiones necróticas que con el tiempo se convirtieron en perforaciones. También se observó necrosis en flores y en el tallo de las panículas

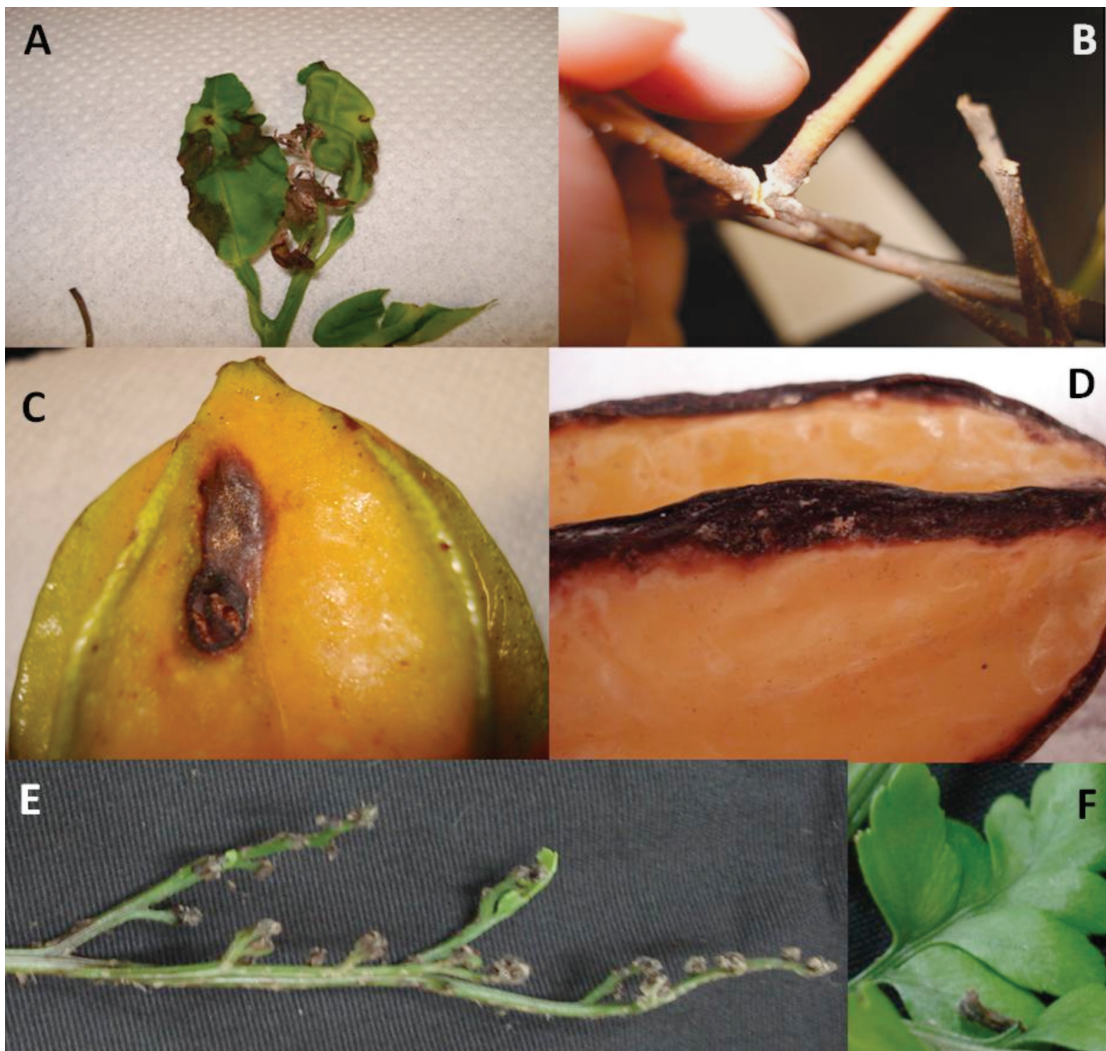


Fig. 2. Síntomas típicos de antracnosis causados por *Colletotrichum* spp., en diferentes cultivos. (A, B) Hojas y ramas secas de limón criollo. (C, D) Carambola. (E, F) Helecho hoja de cuero.

(Figura 3A-H). En papaya, se encontraron lesiones redondeadas, hundidas, con producción de acérvulos en fruto maduro e inmaduro y lesiones sin hundimientos y de color marrón llamadas mancha chocolate. En los pecíolos de las hojas se observaron lesiones pequeñas ovaladas con halos claros (Figura 4A-D).

En total se obtuvieron 220 aislamientos identificados por características morfológicas como *Colletotrichum* sp. Además se recuperaron 30 aislamientos correspondientes a otros hongos como *Fusarium* spp., *Pestalotia* sp., y *Macrohomina* sp., provenientes de mango, papaya y carambola.

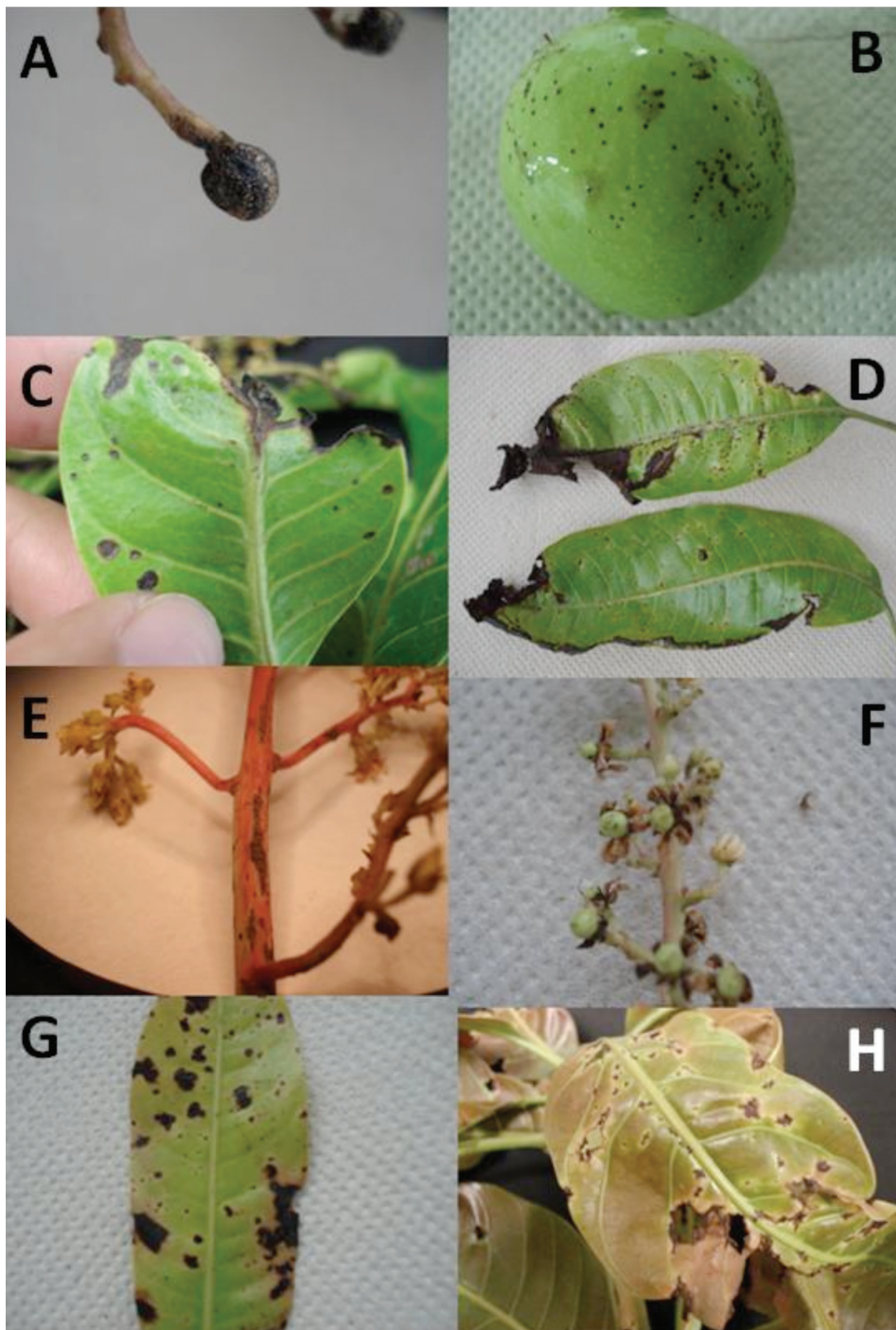


Fig. 3. Síntomas típicos de antracnosis causados por *Colletotrichum* spp., en mango. (A, B) Fruto momificado y fruto inmaduro. (C, D) Hojas maduras. (E, F) Panículas y flores. (G, H) Hojas jóvenes.

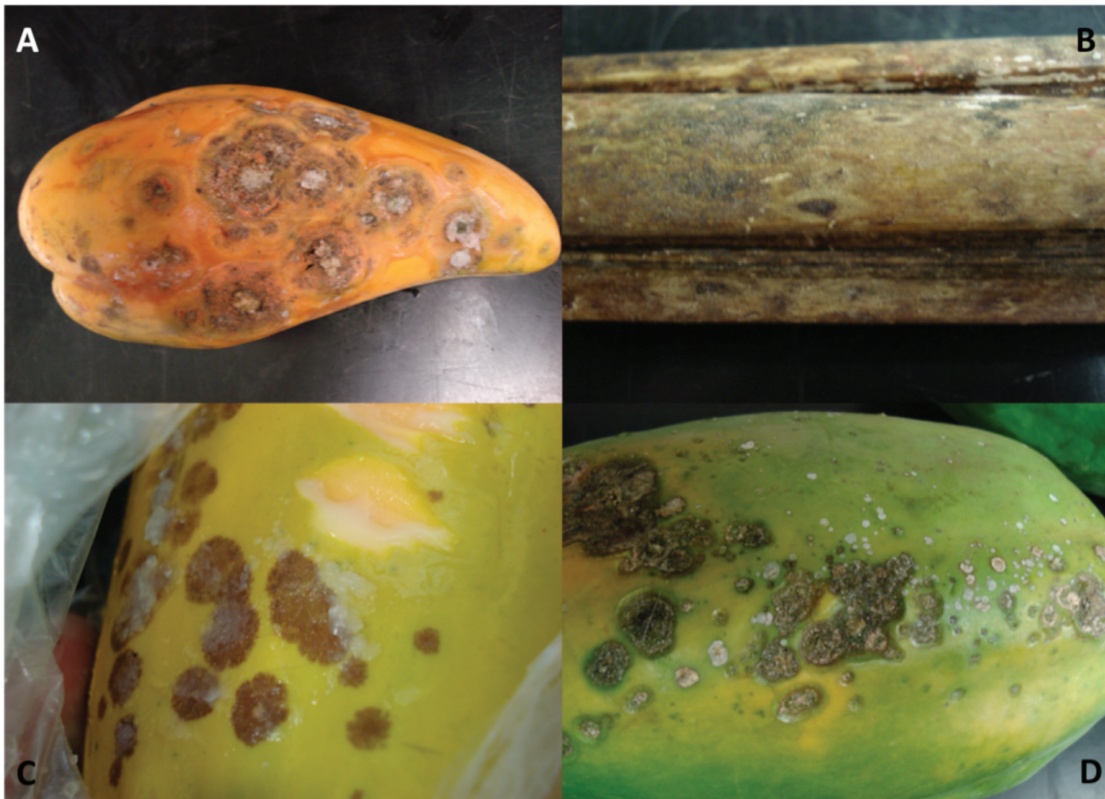


Fig. 4. Síntomas típicos de antracnosis causados por *Colletotrichum* spp., en papaya. (A) Fruto maduro. (B) Pecíolo. (C) Mancha chocolate. (D) Fruto inmaduro.

La morfología de las colonias fue variable (Figura 5) y esta variabilidad dependió de cada hospedero. Las colonias provenientes de mango fueron altamente variables en su morfología (Figura 5A-F). Se obtuvieron colonias blancas y grises con masas naranjas de conidios distribuidas en toda la colonia o en el centro de la misma. Algunos aislamientos presentaron anillos concéntricos y puntos negros (estroma o micelio compactado) distribuidos por toda la colonia (Figura 5D). Algunos aislamientos grises presentaron micelio blanco en su perímetro (Figura 5F). Los aislamientos de *C. acutatum* de mango, provenientes de Florida, se caracterizaron por la distribución de acérvulos naranja intenso, casi rojo, en toda la colonia (Figura 5I). En carambola y papaya, se obtuvieron colonias

blancas y grises con masas naranjas de conidios distribuidas y en el centro de la colonia (Figura 5G y H); de ambos hospederos se recuperaron colonias blancas con centro anaranjado. También se presentaron colonias grises con micelio blanco en el perímetro. En las colonias provenientes de papaya, se observaron anillos concéntricos. Los aislamientos provenientes de helecho hoja de cuero (Figura 5J) fueron grises con masas de conidios naranja (acérvulos) y estroma o micelio compacto. Se obtuvieron 2 tipos de colonias de limón criollo: blancas con el centro naranja y grises con algunas masas de conidios naranja (Figura 5K). Algunas colonias similares a las obtenidas de limón criollo, blancas con centro anaranjado, se recuperaron de carambola (Figura 5L) y de papaya.

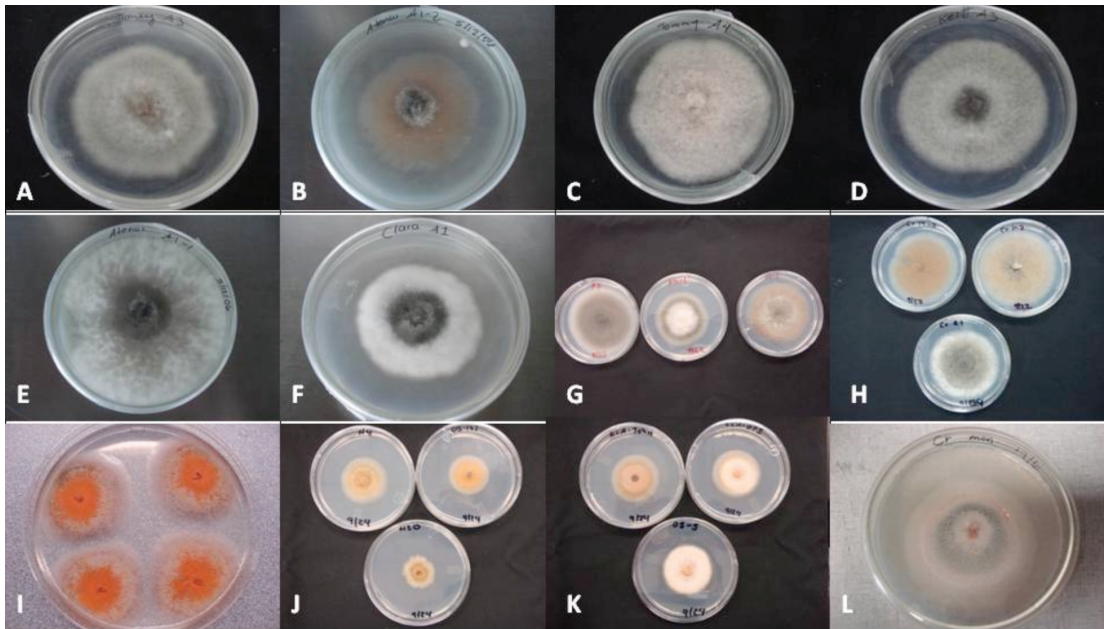


Fig. 5. Morfología de colonias de *Colletotrichum* spp. (A-F) *C. gloeosporioides* aislado de mango. (G) *C. gloeosporioides* de papaya. (H) *C. gloeosporioides* de carambola. (I) *C. acutatum* de mango. (J) *C. acutatum* de helecho hoja de cuero. (K) *C. acutatum* de limón criollo. (L) *C. acutatum* de carambola.

Identificación por PCR con iniciadores específicos y prueba de sensibilidad a benomil

Todos los aislamientos provenientes de helecho hoja de cuero (25), y de limón criollo (25), 3 provenientes de carambola y 33 aislamientos de mango de Florida resultaron positivos en la amplificación por PCR con el iniciador específico para *C. acutatum* CaInt2. El tamaño de la banda obtenida fue de 490 pb (Figura 6). Estos aislamientos resultaron negativos cuando se realizó la PCR con el iniciador específico para *C. gloeosporioides* Cg/fInt1. El resto de aislamientos amplificaron en la PCR con el iniciador específico Cg/fInt1, específico para *C. gloeosporioides*, con el que se obtuvo una banda de 450 pb (Figura 6) y no amplificaron con el primer CaInt2.

La mayoría de los aislamientos fueron sensibles a benomil; 95 aislamientos (43%) no presentaron crecimiento en el medio de PDA con benomil; 19 aislamientos (8,6%) tuvieron una tasa

de crecimiento igual en ambos medios y 106 aislamientos (48%) presentaron menor crecimiento en medio PDA con benomil que en PDA solo. (Cuadro 2).

Los 25 aislamientos de helecho hoja de cuero fueron identificados como *C. acutatum* en la prueba de sensibilidad a benomil y en la PCR. En limón criollo, sucedió lo mismo con 22 aislamientos, mientras que otros 3 según la prueba de benomil correspondían a *C. gloeosporioides* y según la PCR se trataba de *C. acutatum* (Cuadro 2).

En mango, los 33 aislamientos identificados como *C. acutatum* por la PCR, fueron identificados como *C. acutatum* también en la prueba de sensibilidad a benomil, 38 aislamientos fueron identificados como *C. gloeosporioides* en ambas pruebas y 5 aislamientos como *C. gloeosporioides* resistentes a benomil. Por otro lado, 9 aislamientos de mango identificados como *C. acutatum* mediante la prueba de benomil, resultaron ser *C. gloeosporioides* con la PCR con iniciadores específicos.

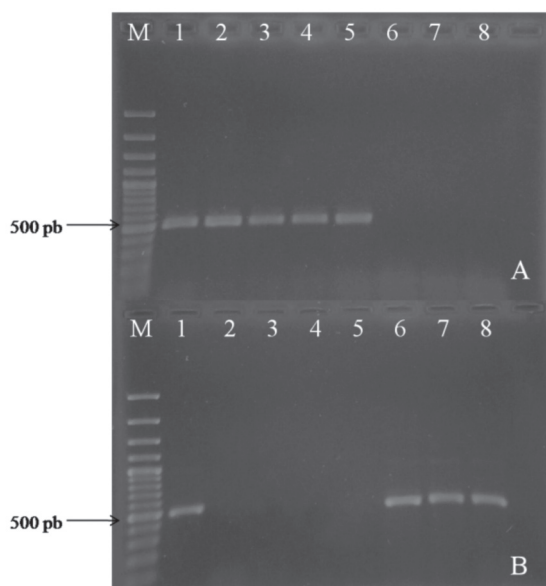


Fig. 6. (A) Fragmentos amplificados con los iniciadores CaInt2 x ITS4 para *C. acutatum*. (B) Fragmentos amplificados usando los iniciadores Cg/fInt1 x ITS4 para *C. gloeosporioides*. (1) Controles positivos para cada especie. Aislamientos provenientes de (2) helecho hoja de cuero, (3) limón criollo, (4) mango/*C. acutatum*, (5) carambola/*C. acutatum*, (6) mango/*C. gloeosporioides*, (7) carambola/*C. gloeosporioides*, (8) papaya.

Cuadro 2. Sensibilidad a benomil de aislamientos según hospedero.

Hospedero	Número de aislamientos					
	A		B		C	
	C.a*	C.g**	C.a	C.g	C.a	C.g
Helecho hoja cuero	25	0	0	0	0	0
Limón criollo	22	0	3	0	0	0
Mango	33	9	0	5	0	38
Papaya	0	14	0	8	0	3
Carambola	3	0	0	3	0	54
Total	106		19		95	

A: Tasa de crecimiento menor en medio PDA + benomil que en PDA (*C. acutatum* sensible a benomil).

B: Tasa de crecimiento igual en medio PDA con benomil y en medio PDA. (*C. gloeosporioides* resistente a benomil).

C: Ausencia de crecimiento en medio PDA con benomil. (*C. gloeosporioides* sensible a benomil).

**C. acutatum* según resultados de la PCR.

** *C. gloeosporioides* según resultados de la PCR.

En el caso de papaya, los 14 aislamientos identificados como *C. acutatum* mediante la prueba de sensibilidad a benomil fueron identificados como *C. gloeosporioides* con la PCR. También se identificaron 11 aislamientos más como *C. gloeosporioides* con esta prueba, de los cuales 8 correspondieron a aislamientos resistentes a benomil (Cuadro 2).

Por último, en carambola hubo concordancia con los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad a benomil y en la PCR con iniciadores específicos (Cuadro 2).

Medición de colonias y conidios de *C. acutatum*

Los conidios de *C. acutatum* de mango fueron más grandes que los de carambola (Cuadro 3), mientras que el diámetro de las colonias procedentes de carambola fue mayor que en las procedentes de mango. Las colonias de *C. acutatum* presentaron una tasa de crecimiento menor que las colonias de *C. gloeosporioides*. Los conidios de *C. acutatum* provenientes de mango y carambola presentaron extremos fusiformes, al contrario de los conidios procedentes de *C. gloeosporioides* (Figura 7).

Cuadro 3. Longitud de conidios y diámetro de colonias de aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* de carambola y mango.

Aislamiento	Longitud de conidio (μm)*	Diámetro de colonia (cm)**
Carambola (Car 1)	6,3±0,67	6,10±0,26
Carambola (Car 2)	6,4±1,35	5,98±0,15
Carambola (<i>C. gloeosporioides</i>)	No se midió	6,96±0,17
Mango (10)	8,8±0,92	4,68±0,22
Mango (38)	8,6±0,84	4,44±0,23
Mango (43)	8,7±1,33	4,62±0,28
Mango (<i>C. gloeosporioides</i>)	No se midió	6,08±0,11

*Promedio de 10 conidios por aislamiento±Desviación estándar.

**Promedio de 5 colonias por aislamiento±Desviación estándar.

Edad de los cultivos: 8 días.

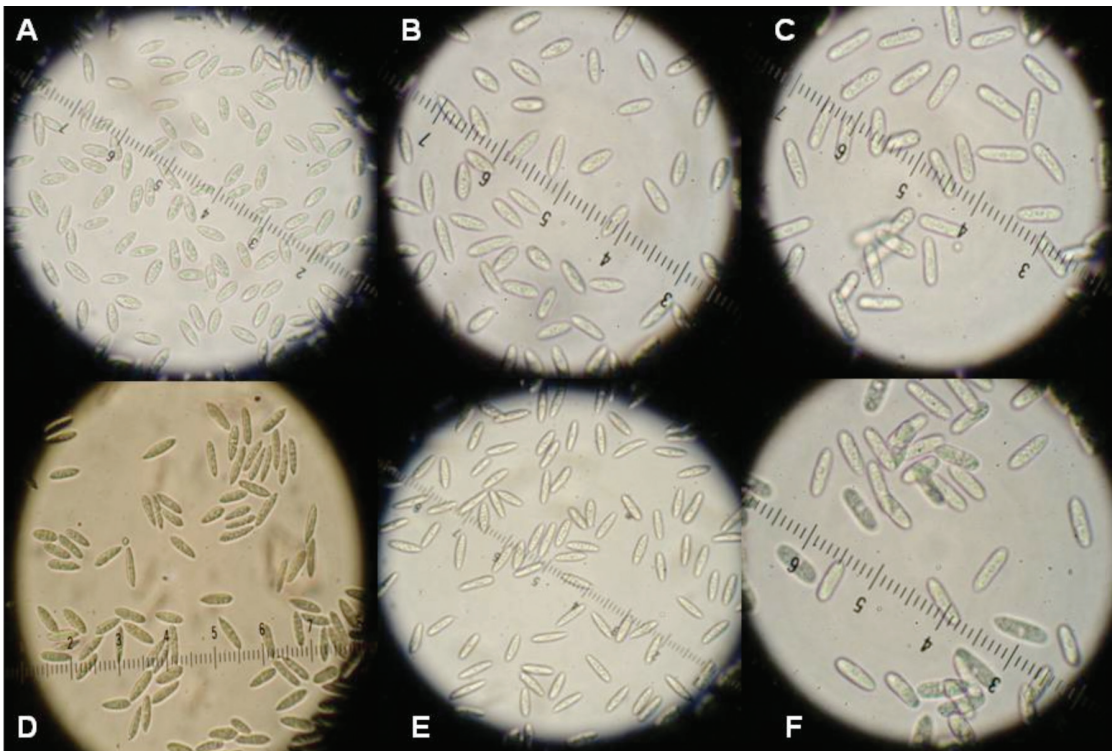


Fig. 7. Conidios de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. (A, B) *C. acutatum* de carambola. (C) *C. gloeosporioides* de carambola. (D, E) *C. acutatum* de mango. (F) *C. gloeosporioides* de mango.

DISCUSIÓN

La morfología de las colonias y la sensibilidad a benomil son características útiles para la identificación de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. En este estudio se determinó la presencia de estos patógenos en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango mediante la prueba de sensibilidad a benomil y mediante la PCR con iniciadores específicos como prueba definitiva y certera para la determinación de la especie.

En el caso de limón criollo y helecho hoja de cuero se determinó a *C. acutatum* como agente causal de la antracnosis en estos hospederos, lo que corrobora los resultados obtenidos por Timmer en Florida (2000) y Schiller et ál. (2006) en Costa Rica (2006). La prueba de benomil resultó

ser una prueba confiable en ambos casos, como lo demostraron estudios anteriores en cítricos (Peres et ál. 2004).

La mayoría de informes sobre antracnosis en cultivos tropicales señalan a *C. gloeosporioides* como agente causal de la enfermedad (Liyanage et ál. 1992, Mills et ál. 1992); sin embargo, existen informes sobre *C. acutatum* como causante de antracnosis en hospederos tropicales (Wharton y Diéguez 2004). En el presente estudio no se encontró evidencia de *C. acutatum* como causante de la antracnosis en papaya y mango en Costa Rica, mientras que en carambola se encontraron 3 aislamientos de *C. acutatum*. Al contrario, en Florida, para el caso de mango se aisló solamente a *C. acutatum* de los tejidos muestreados, lo que refuerza los datos presentados por Rivera et ál. (2006). De carambola de Florida se aisló

únicamente *C. gloeosporioides*. Tanto en mango como en carambola y papaya, no hubo diferencias entre los síntomas causados por *C. acutatum* y los inducidos por *C. gloeosporioides*.

La prueba de benomil, aplicada como prueba única, no permitió la identificación de especies en la mayoría de los casos; el 96,5% los aislamientos identificados molecularmente como *C. acutatum* resultaron positivos en la prueba de benomil; sin embargo, solo 78,3% de los aislamientos identificados como *C. acutatum* con la prueba de benomil fueron positivos en el análisis molecular.

El comportamiento de los aislamientos que presentaron igual crecimiento en medio con o sin benomil podría deberse a resistencia a este fungicida, pero se deben realizar más estudios para comprobarlo. La resistencia a benomil ha sido ampliamente documentada para *C. gloeosporioides* (Prior et ál. 1992, Barquero 2000) pero no para *C. acutatum*.

Asimismo, los 9 aislamientos de mango y los 14 de papaya identificados como *C. acutatum* mediante la prueba de benomil, y como *C. gloeosporioides* con la PCR, podrían ser aislamientos de *C. gloeosporioides* que no son totalmente resistentes al benomil, pero sí empiezan a mostrar resistencia parcial a este fungicida (Cuadro 2). Por consiguiente, se deben vigilar las aplicaciones de benzimidazoles en estos cultivos ya que se observó una tendencia a la resistencia y resistencia total de los aislamientos de *C. gloeosporioides* proveniente de estos cultivos.

Con respecto a la morfología de las colonias, ésta se debe establecer según el cultivo. En general, se definen las colonias de *C. acutatum* como colonias con una menor tasa de crecimiento (como lo demostraron las mediciones hechas en este estudio), de color blanco o naranja claro y algunas cromogénicas. Sin embargo, estas variables solamente se deberían analizar si existen muestras positivas de *C. gloeosporioides* o de *C. acutatum* en el hospedero que se analiza, para realizar una comparación objetiva.

La variabilidad en la morfología de las colonias provenientes de todos los cultivos

analizados fue alta y en muchos casos el mismo aislamiento cambió su morfología al pasarlo a un medio de cultivo nuevo o al envejecer. Aislamientos de mango, carambola y papaya mostraron fenotipos distintivos de *C. acutatum*, pero los análisis demostraron que se trataba de *C. gloeosporioides*; asimismo aislamientos provenientes de helecho hoja de cuero identificados como *C. acutatum*, presentaron fenotipos similares a los de mango o papaya identificados como *C. gloeosporioides*.

La identificación por PCR de *C. acutatum* permitió posteriormente el análisis morfológico de estas colonias. Las colonias de *C. acutatum* provenientes de mango fueron blancas y con gran cantidad de acérvulos color naranja intenso (Figura 5G). Las colonias de *C. acutatum* de carambola fueron de color naranja claro, casi blanco, mucho más claras que las de *C. gloeosporioides*, y los conidios de aislamientos de ambos hospederos presentaron extremos puntiagudos.

En las colonias provenientes de helecho, algunas fueron claras, color naranja y algunas fueron grises, mientras que las provenientes de limón criollo fueron en su mayoría claras. Por lo tanto, no se debería asignar ninguna característica morfológica en general, o al menos no se debe identificar aislamientos de *Colletotrichum* sin tener un aislamiento con el cual comparar que provenga del mismo hospedero. Todas las herramientas deben utilizarse en conjunto para la adecuada identificación de especies ya que cada una de ellas por sí sola podría conducir a errores en la identificación o a un gasto innecesario de dinero, recursos humanos y tiempo.

El hallazgo de *C. acutatum* en carambola tiene importantes implicaciones epidemiológicas y es el primer informe de esta especie en carambola en Costa Rica. Aunque *C. acutatum* se encontró en menor frecuencia que causa antracnosis, un manejo inadecuado de las aplicaciones de fungicidas en este cultivo podría conducir a la selección de *C. acutatum*, que podría llevar a un equilibrio entre las poblaciones de ambas especies o incluso el dominio de la población de *C. acutatum* sobre *C. gloeosporioides* debido a la

diferencia en sensibilidad a benomil entre ambas especies. Las mismas precauciones se deben de tener en cuenta al considerar el hallazgo de *C. acutatum* en mango en Florida.

Aunque en este estudio no se demuestra la presencia de *C. gloeosporioides* en mango en las regiones muestreadas en Florida, inconsistencias en el desarrollo de epidemias de antracnosis en mango en esta región sugieren que existe diversidad en las poblaciones del patógeno (Davis 1999).

Davis (1999) y Rivera et ál. (2006) identificaron a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* que causa antracnosis en mango en Florida. El primero identificó un grupo (basado en RAPD y pruebas de patogenicidad) proveniente de aislamientos de inflorescencias y frutos pequeños, menos virulento en hojas y frutos que otros aislamientos pero más virulento en inflorescencias. Los miembros de este grupo al igual que los aislamientos realizados en este estudio y los realizados por Rivera et ál. (2006), presentaron esporas punteadas en ambos extremos, lo que corresponde a *C. acutatum*. A diferencia de Davis (1999) y Rivera et ál. (2006), los aislamientos realizados en esta investigación provenían también de hojas, además de inflorescencias, y no se realizaron aislamientos de frutos inmaduros.

En comparación con el estudio realizado por Rivera et ál. (2006), la distribución de *C. acutatum* fue más amplia, ya que en su estudio solamente logró aislar 8 individuos procedentes de Homestead, mientras que en la actual investigación se aisló de Miami y Tampa únicamente *C. acutatum*. Ambos muestreos fueron realizados con 7 años de diferencia, lo que indicaría que la estructura y distribución de las poblaciones de *Colletotrichum* pudo haber variado con el tiempo ya que como se mencionó anteriormente, *C. acutatum* es mucho más resistente a benomil y azoxistrobina y el manejo de la enfermedad mediante estos productos pudo favorecer la proliferación de *C. acutatum* como fue predicho por Rivera et ál. 2006.

Los resultados obtenidos en investigaciones realizadas por otros autores indican que el análisis de las poblaciones mediante RAPDs

podría arrojar resultados confusos, no es una metodología rigurosa debido a que individuos pertenecientes a una misma especie pueden ser divididos en grupos (Rivera et ál. 2006), con la identificación de especies por PCR con iniciadores específicos la mejor herramienta.

La diversidad de poblaciones en Florida ayuda a explicar por qué algunos cultivares de mango, resistentes a antracnosis, presentan susceptibilidad (Davis 1996) y además cobra importancia el hecho de determinar las especies presentes en cada zona antes de liberar variedades resistentes.

Finalmente, la humedad relativa y las temperaturas medias en los sitios muestreados en Florida son similares a las de las zonas en Costa Rica donde se produce mango, excepto por las variaciones a finales y principios de cada año, donde las 2 variables son menores en Florida. Estas similitudes en el clima, en conjunto con el comercio globalizado en la región y el manejo químico de la antracnosis en mango podrían conducir a cambios en las poblaciones de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* presentes en las diferentes zonas donde se da la producción de mango.

LITERATURA CITADA

- ADASKAVEG J.E., HARTIN R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87:979-987.
- AGOSTINI J.P., TIMMER L.W., MITCHELL D.J. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82:1377-1382.
- ARAUZ L.F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease* 84:600-611.
- ARCE E. 2003. Efecto de la caída prematura de los frutos de los cítricos causada por el hongo *Colletotrichum acutatum* en la producción de naranja en la Región Huetar Norte de Costa Rica. Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 60 p.
- BARQUERO C. 2000. Determinación de la sensibilidad a benomil en poblaciones de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de mango (*Mangifera indica*) en Costa Rica. Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 32 p.

- BERNSTEIN B., ZEHR E.I., DEAN R.A., SHABI E. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Disease* 79:478-482.
- DAVIS M.J. 1999. Genetic and pathological diversity of the mango anthracnose pathogen in Florida. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 112:197-200.
- FREEMAN S., MINZ D., MAYMON M., ZVEIBIL A. 2001. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology* 91:586-592.
- LARDNER R., JOHNSTON P.R., PLUMMER K.M., PEARSON M.N. 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. *Mycological Research* 103:275-285.
- LIYANAGE H.D., McMILLAN R.T., KISTLER H.C. 1992. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82:1371-1376.
- MILLS P.R., HODSON A., BROWN A.E. 1992. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical crops, pp. 250-269. In: J.A. Bailey and M.J. Jeger (eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK. CAB International.
- PERES N.A., SOUZA N.L., PEEVER T.L., TIMMER L.W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease* 88:25-130.
- PERES N.A., TIMMER L.W., ADASKAVEG J.E., CORRELL J.C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 89:784-796.
- RIVERA L., LUGO Y., McGOVERN R., SEIJO T., DAVIS M. 2006. Occurrence and distribution of *Colletotrichum* spp., on mango (*Mangifera indica* L.) in Puerto Rico and Florida, USA. *Plant Pathology Journal* 5:191-198.
- SCHILLER M., LÜBECK M., SUNDELIN T., CAMPOS L.F., DANIELSEN S., JENSEN D.F., MADRIZ K. 2006. Two subpopulations of *Colletotrichum acutatum* are responsible for anthracnose in strawberry and leatherleaf fern in Costa Rica. *European Journal of Plant Pathology* 116:107-118.
- SREENIVASAPRASAD S., SHARADA K., BROWN A.E., MILLS P.R. 1996. PCR based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45:650-655.
- SREENIVASAPRASAD S., TALHINHAS P. 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology* 6:361-378.
- TIMMER L.W., AGOSTINI J.P., ZITKO S.E., ZULFIQAR M. 1994. Postbloom fruit drop of citrus, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. *Plant Disease* 78:329-334.
- TIMMER L.W., BROWN G.E. 2000. Biology and control of anthracnose diseases of citrus, pp. 300-316. In: D. Prusky, S. Freeman and M.B. Dickman (eds.). *Colletotrichum; Host Specificity, Pathology and Host- Pathogen Interactions*. St.Paul, MN, US. APS Press.
- UREÑA A.R., MITCHELL D.J., LEGARD D.E. 2001. Over-summer survival of inoculum for *Colletotrichum* crown rot in buried strawberry crown tissue. *Plant Disease* 85:750-754.
- WHARTON P.S., DIÉGUEZ J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61:3-22.
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. San Diego, CA, US. Academic Press.
- XIAO C.L., MACKENZIE S.J., LEGARD D.E. 2004. Genetic and pathogenic analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. *Phytopathology* 94:446-453.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr