



Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela

Ilka P. Domínguez-Guerrero¹, Sari R. Mohali-Castillo², Mauricio A. Marín-Montoya³ & Henry B. Pino-Menesini⁴

¹Laboratorio de Entomología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, 5101-A; ²Centro de Estudios Forestales y Ambientales de Postgrado (CEFAP), Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, 5101-A; ³Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia, A.A. 3840; ⁴Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, 5101-A

Autor para correspondencia: Ilka P. Domínguez G., e-mail: ilka@ula.ve

RESUMEN

Se realizó la caracterización del agente causal de la antracnosis de hojas, raquis y frutos de palma aceitera en el sur del Lago de Maracaibo (Venezuela). Las pruebas morfológicas incluyeron tasa de crecimiento, diámetro, color y tipo de micelio, además de la forma y tamaño de conidias. La caracterización molecular incluyó pruebas de PCR específica, secuenciación de ITS del ADNr y análisis de variabilidad mediante RFLPs y RAPDs. Finalmente, se realizaron pruebas de patogenicidad sobre plantas de un año y frutos desprendidos. Las evaluaciones morfológicas permitieron identificar al hongo como perteneciente al género *Colletotrichum*, aunque los 50 aislados presentaron un amplio rango de variación fenotípica. Las amplificaciones con el cebador específico CgInt y el genérico ITS4, fueron positivas para los 50 aislados, sugiriendo que el agente causal de esta enfermedad hace parte del complejo de especies *Colletotrichum gloeosporioides*. Este resultado fue confirmado por la secuenciación de las regiones ITS. Las evaluaciones de variabilidad genética indicaron que la población estudiada tiene una estructura fundamentalmente clonal, aunque los RAPDs permitieron diferenciar algunos aislamientos del genotipo predominante. Las pruebas de patogenicidad reprodujeron los síntomas inicialmente observados en el campo, siendo posible el re-aislamiento del hongo a partir de los frutos y plantas inoculadas.

Palabras-clave: antracnosis, patogenicidad, RFLP, RAPD, secuenciación.

ABSTRACT

Characterization and genetic variability of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantations from Venezuela

Characterization was performed on the causal agent of anthracnose affecting leaves, rachis and fruits of oil palms in the southern region of Maracaibo Lake (Venezuela). Morphological tests included colony growth rate, diameter, color and type of mycelium, as well as the shape and size of conidia. Molecular characterization included specific PCR tests, ITS rDNA sequencing and analysis of variability using RFLPs and RAPDs. Finally, pathogenicity tests were conducted on one-year old plants and detached fruit. Morphological evaluations allowed identification of a fungus belonging to the genus *Colletotrichum*, although the 50 isolates studied showed a wide range of phenotypic variation. Amplifications with the specific CgInt primer and the generic ITS4 primer were positive for all isolates, suggesting that the causal agent of this disease is part of the species complex *Colletotrichum gloeosporioides*. This result was confirmed by sequencing of ITS regions. Assessments of genetic variability indicated a clonal population structure, although RAPDs allowed for the differentiation of some isolates from the predominant genotype in the population. Finally, pathogenicity tests with *C. gloeosporioides sensu lato* reproduced the symptoms originally observed in the field, and the fungus was re-isolated from inoculated fruits and plants.

Key words: anthracnose, pathogenicity, RFLP, RAPD, sequencing.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el cultivo de la palma aceitera, también llamado palma africana, se ha venido expandiendo en forma acelerada en un número creciente de países de América del Sur (Carrere, 2006). La palma de aceite es la oleaginosa que mayor cantidad de aceite produce por unidad de superficie (Labarca et al., 2006). Sin embargo,

extensas áreas de plantaciones de palma bajo condiciones de monocultivo han ocasionado una modificación del medio ambiente natural, creando un microclima diferente con condiciones favorables para el desarrollo de enfermedades (FONAIAP, 1991). Algunas enfermedades solo afectan durante un estado específico de desarrollo del cultivo (ej. viveros, plantas jóvenes, plantación adulta), siendo la antracnosis una de las más importantes en plantas juveniles

y viveros (Chinchilla & Escobar, 2007). Los reportes generales de enfermedades de palma aceitera presumen que el agente causal de la antracnosis es una especie del género anamórfico *Colletotrichum*; sin embargo en Venezuela hasta el momento no se ha determinado inequívocamente la especie responsable de dicha enfermedad (Salazar et al., 1992; Chinchilla & Escobar 2007).

Los estudios taxonómicos en *Colletotrichum* se han centrado principalmente en la identificación de las especies, y en la caracterización de las subpoblaciones dentro de cada especie (Freeman et al., 1998; Martínez et al., 2009). La diferenciación entre las especies de *Colletotrichum* responsables de enfermedades es de vital importancia para el desarrollo de estrategias y aplicación de controles efectivos (Freeman et al., 1998; Photita et al., 2005). La identificación tradicional y la caracterización de las especies de *Colletotrichum* se han basado principalmente en las diferencias morfológicas en cuanto a características de color y tamaño de la colonia, temperatura óptima y tasa de crecimiento, así como forma de las conidias y apresorios, presencia o ausencia de setas, y la existencia del estado teleomórfico *Glomerella* (Freeman et al., 1998; Freeman et al., 2000; Photita et al., 2005). Además de los factores ambientales que influyen sobre la estabilidad de los rasgos morfológicos y la existencia de formas intermedias, los criterios morfológicos no son siempre los adecuados para ofrecer confiabilidad en la identificación de las especies de *Colletotrichum* (Freeman et al., 1998; Afanador-Kafuri et al., 2003). Por esto, en los últimos años se han incorporado análisis filogenéticos de regiones ribosomales (ej. ITS, 28S, etc.) y funcionales (ej. actina, calmodulina, β -tubulina, etc) como aspectos fundamentales para la identificación de especies dentro de este género (Cai et al., 2009; Hyde et al., 2009).

De esta forma, a partir de filogenias de múltiples genes, se ha encontrado que especies como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. corresponden realmente a complejo de especies polimórficas que contiene una serie de subgrupos con diferentes grados de patogenicidad, especificidad y diversidad genética, por lo cual resulta muy difícil su identificación utilizando sólo criterios morfológicos (Freeman et al., 1998; Meizhu et al., 2005; Cai et al., 2009; Hyde et al., 2009).

C. gloeosporioides ha sido reportada afectando un amplio rango de hospederos a nivel mundial que se extiende al menos a 470 géneros de plantas, incluyendo la antracnosis en palmas de diferentes especies (Oruade-Dimaro & Ekundayo, 1992; Uchida & Kadooka, 1997; Carrington et al., 2001; Charchar et al., 2002; Nakamura et al., 2008). Recientemente, se han registrado síntomas de antracnosis en hojas, raquis y frutos de plantas de palma aceitera de cuatro a seis años de edad en cultivos establecidos en la zona sur del Lago de Maracaibo en Venezuela. La presente investigación tuvo como objetivo realizar la identificación morfológica y molecular del agente causal de la antracnosis en plantas de palma aceitera en esta zona, así como también comprobar su patogenicidad en plantas establecidas en campo y frutos de palma aceitera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del hongo

Plantas enfermas con síntomas de antracnosis fueron colectadas en una zona de 300 ha de palma aceitera en el sur del Lago de Maracaibo en Venezuela (Figura 1). Cincuenta aislados monoconidiales de *Colletotrichum* sp. se obtuvieron de colonias iniciales provenientes de hojas, raquis y frutos. Todos los aislados fueron cultivados inicialmente en medio de agar-agua, suplementado con ácido láctico (AA) (BD Difco, EEUU) (2,25 g de agar, 100 mL de agua destilada estéril, ácido láctico 50%) e incubados a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 8 h de luz blanca fluorescente. Las colonias emergentes fueron transferidas a medio de papa-dextrosa-agar (PDA) (BD Difco) (19,5 g de PDA comercial, 500 mL de agua destilada estéril).

Identificación morfológica

Discos de micelio de 8 mm de diámetro extraídos de los bordes de colonias iniciales crecidas en medio de PDA de 4 días de edad, fueron transferidos a nuevas placas con medio de PDA e incubados en la oscuridad a 25°C . Se evaluó el patrón de crecimiento y el tipo de micelio. El diámetro de la colonia fue estimado a través de la lectura de las medias entre los dos diámetros ortogonales de la colonia, con intervalos de 24 h durante seis días. La tasa de crecimiento se estimó a los seis días de evaluación usando la media de los valores de crecimiento (mm por día); estas pruebas fueron discriminadas por tejido de aislamiento (hoja, raquis y fruto). El color del tope y reverso de las colonias fue reconocido usando la nomenclatura del color propuesta por Kornerup & Wanscher (1978). Para el análisis microscópico se evaluó la forma y el tamaño de las conidias que se registró a los 9 días después de la siembra. Las conidias fueron removidas de la zona de producción y posteriormente montadas en lactofenol para efectuar las mediciones en un microscopio fotónico Zeiss, modelo Axioplan (Jena, Alemania). Se midió la longitud y ancho en μm de 60 conidias de tres aislamientos que fueron seleccionados de hoja, raquis y fruto que presentaban heterogeneidad en el color de sus colonias; los mismos fueron también incluidos en la secuenciación. Los datos morfológicos fueron analizados usando la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de comparación de medias de Duncan que fue calculada a $P < 0,05$, con el paquete estadístico SPSS Statistics 17.0 versión para Windows.

Extracción de ADN

Los 50 aislados monoconidiales fueron sembrados en placas con medio PDA; a los 5 días fueron transferidos a medio líquido de extracto de malta (30 g de extracto de malta, 22,5 g de glucosa, 1500 mL de agua destilada estéril) y se incubaron a 25°C en oscuridad por 8 días, para obtener suficiente micelio para ser filtrado con una bomba de vacío y refrigerado a -20°C . El ADN se extrajo a partir del micelio macerado con nitrógeno líquido y buffer



FIGURA 1 - (A.B.C.D.E.F) Síntomas de antracnosis en hojas y frutos de palma aceitera bajo condiciones de campo en Venezuela y **(G.H.I.)** como resultado de las pruebas de patogenicidad.

de extracción CTAB 2X (2% CTAB (w/v), 100 mM de TRIS HCl pH 8,0, 1,4 M de NaCl y 20 mM de EDTA pH 8,0), siguiendo el procedimiento reportado por Silva et al. (2009). La integridad del ADN extraído fue determinado por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, suplementado con 3 μ L de bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹) y la concentración por absorbancia en un espectrofotómetro Thermo scientific, Genesys 6 (Waltham, EEUU) a 260 nm.

Amplificación por PCR y secuenciación de ITS

Se emplearon cebadores universales ITS4 e ITS5 (White et al., 1990). Cada reacción de PCR de 25 μ L incluyó los siguientes componentes: 1X de buffer de enzima (100 mM Tris-HCl pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40), 0,2mM de dNTPs, 0,5 μ M de cebadores, 1,8 mM de

MgCl₂, 1 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas, Lituania), 16,5 μ L de agua ultra pura estéril y 50 ng de ADN. En todas las evaluaciones se incluyó un control negativo donde la reacción no contenía muestra de ADN. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Biometra T3000 (Göttingen, Alemania), el programa utilizado consistió de una desnaturalización inicial a 98°C por 3 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Posterior a la amplificación se tomaron 5 μ L de los productos de reacción que fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, comparándose con el marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas). La visualización de las bandas amplificadas se realizó a través del software Biodoc analyze en un transiluminador UV (Biometra).

Diez de los productos de PCR del tamaño esperado, fueron purificados para la secuenciación mediante el kit de purificación *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, Alemania) para proceder a su secuenciación directa en ambas direcciones utilizando los primers ITS4 e ITS5 mediante el kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, EEUU) y su análisis en un secuenciador ABI Prism 3730XL (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el software Chromas, generándose secuencias consenso con el programa BioEdit y confirmándose su identidad por comparación con la base de datos del GenBank, mediante el programa BLASTn. A partir de los resultados del BLAST, se obtuvieron secuencias de aislamientos de varias especies de *Colletotrichum* en diferentes hospederos de diversas regiones del mundo, incluyendo las accesiones AF411701 - FJ788417 y EU371022 - FJ972609, que corresponden a secuencias ribosomales de los tipos de *C. acutatum* (paratipos) y *C. gloeosporioides* (epítipos), respectivamente (Cai et al., 2009). Se realizó un alineamiento con las secuencias obtenidas en el estudio mediante el software Clustal W y la matriz de alineamiento generada se convirtió al formato Nexus, empleándose para realizar un análisis filogenético utilizando el método de Máxima parsimonia con el software PAUP 4.0b. El soporte de la topología interna del dendrograma fue evaluado mediante análisis de Bootstrap con 1000 permutaciones (Photita et al., 2005).

Adicionalmente, se realizaron reacciones de PCR con los cebadores específicos CgInt (Mills et al., 1992) y CaInt2 (Sreenivasaprasad et al., 1996) que permiten amplificar diferencialmente las regiones ribosomales de los complejos de especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, respectivamente, cuando se combinan con el primer universal ITS4 (Freeman et al., 2000). Las condiciones de PCR fueron similares a las descritas anteriormente. Dos aislados de referencia obtenidos en *Rubus glaucus* por Afanador-Kafuri (2011) y representando *C. gloeosporioides sensu lato* A1V-025A y *C. acutatum sensu lato* C-006 fueron utilizados como controles positivos para garantizar el correcto funcionamiento de los cebadores. Adicionalmente, en todas las evaluaciones se incluyó un control negativo, donde la reacción no contenía muestra de ADN.

RFLPs de ITS

Con las secuencias de las regiones ITS de los 10 aislados y los depositados en el GenBank, se realizó un análisis de restricción virtual mediante el software Webcutter, para la selección de las enzimas de restricción a utilizar en las pruebas de RFLP, siendo empleadas las enzimas *EcoRV*, *Hin6I*, *MspI*, *TaqI*, *CfoI* y *BamHI* (Fermentas). Cada reacción estuvo conformada por 10 µL de reacción total, conteniendo los siguientes componentes: 1X de buffer de enzima, 2 U de cada enzima, 3 µL de producto de PCR y 5,5 µL de agua ultra pura estéril. Las reacciones fueron incubadas en baño María a 37°C durante 24 h. La separación de los fragmentos de restricción se efectuó por

electroforesis en gel de agarosa al 2,2%. Se evaluaron los patrones electroforéticos obtenidos para cada enzima de restricción y se determinó el número de bandas generadas y su tamaño aproximado por comparación con el marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas).

RAPDs

Se evaluaron inicialmente nueve cebadores de las series OPAN, OPBA, OPE, E, de la compañía Operon (Alameda, EEUU) en cinco aislamientos elegidos al azar. Para las pruebas posteriores fueron seleccionados por generar mayor cantidad de bandas legibles y repetibles los cebadores OPE-03 (5'CCAGATGCAC3'), OPE-06 (5'AAGACCCCTC3'), OPAN-15 (5'TGATGCCGCT3'), OPBA-11 (5'CCACCTTCAG3') y E-19 (5'ACGGCCTATG3'). Las reacciones de RAPDs incluyeron los siguientes componentes: 10X de buffer de enzima, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de cebadores, 2,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas), 12,8 µL de agua ultra pura estéril y 3 µL ADN molde. El programa de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 98°C por 3 min, seguida por 40 ciclos a 95°C por 1 min, 34°C por 1 min, 72° por 1.5 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, determinando su tamaño por comparación con el marcador de peso GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas). El análisis de los RAPD se realizó a partir de la construcción de una matriz binaria, que se utilizó para la elaboración de la matriz de similitud mediante el índice SM (*Simple matching*) y el programa SimQual del software NTSYS-pc Version 1.8 (Exeter Software, EEUU). Posteriormente, se generó un dendrograma UPGMA con el programa SAHN de dicho software. El nivel de diversidad genética se calculó mediante el índice de Nei y la diversidad genotípica se calculó con el índice de Shannon, utilizando el programa POPGEN32 (Universidad de Alberta, Canadá).

Comprobación de la patogenicidad

Se inocularon 10 plantas de un año de edad, seleccionadas al azar en un cultivo de palma aceitera. Las plantas se encontraban establecidas en campo abierto, en el sector Río Frío de la zona sur del Lago de Maracaibo en Venezuela; se registraron temperaturas promedio de 36°C y humedad relativa del 70%. Los hongos se sembraron en placas de PDA y fueron incubados a una temperatura de 25°C durante 10 días. A las plantas se les realizó una punción en los folíolos de las hojas; mientras que para la inoculación de los raquis se desprendieron manualmente algunos folíolos para colocar los discos sobre las superficies descubiertas. El inóculo consistió en discos de PDA de 8 mm de diámetro con micelio del hongo, que fueron colocados directamente sobre la superficie del tejido a infectar. Posteriormente se colocó algodón estéril humedecido con 5 mL de agua destilada estéril y se sostuvo con una banda de papel Parafilm. Como grupo control se utilizaron cinco plantas, las cuales fueron

inoculadas con discos de PDA sin micelio. Posterior a la inoculación, todas las plantas fueron cubiertas con una bolsa plástica transparente en la hoja que contenía los foliolos y el raquis inoculado, esto con el fin de generar condiciones de cámara húmeda. Las bolsas se retiraron cuatro días después de la inoculación y las plantas fueron examinadas durante cuatro semanas consecutivas para registrar la evolución de la enfermedad. Se realizaron re-aislamientos a partir de las plantas infectadas artificialmente. También se efectuaron inoculaciones en frutos sanos procedentes de palmas en producción de cinco años de edad. Se usaron 48 frutos que fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio al 0,5% durante 1 min y luego lavados en tres cambios de agua destilada estéril y secados con papel absorbente estéril. Se infectaron 32 frutos a los que se les efectuó una punción y se les colocó un disco de PDA con micelio. Para el grupo control se utilizaron los 16 frutos restantes que fueron inoculados con discos de PDA sin micelio. Los frutos fueron colocados asépticamente en cajas petri, y fueron incubados en cámara húmeda a una

temperatura de 25°C. Se efectuaron observaciones diarias durante una semana, para registrar la evolución de los síntomas y aparición de los signos del patógeno. A partir de los frutos infectados artificialmente se realizaron re-aislamientos.

RESULTADOS

Identificación morfológica

Los 50 aislados monoconidiales cultivados en PDA desarrollaron colonias fúngicas similares a las colonias inicialmente aisladas de las plantas sintomáticas. El patrón de crecimiento de todas las colonias fue radial o en círculos concéntricos. El tipo de micelio fue liso en los primeros días y aéreo con aspecto algodonoso o denso a mayor edad de la colonia; sin embargo, en algunos aislados se observaron colonias con micelio subaéreo y plano (Figura 2). El 80% de las colonias evaluadas presentaron micelio de tipo aéreo-algodonoso, mientras el 20% se caracterizaron por un micelio de tipo subaéreo-plano (Tabla 1).

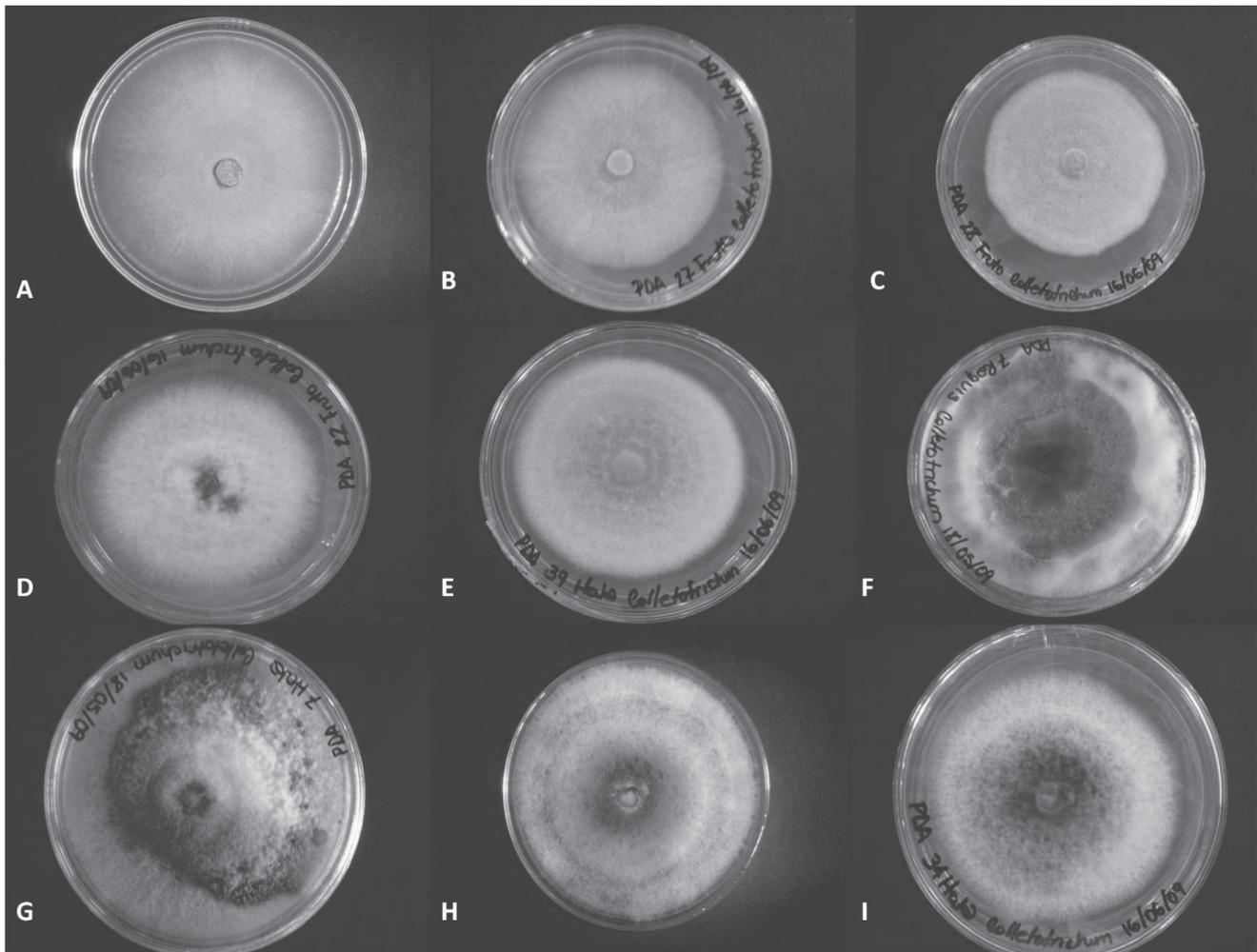


FIGURA 2 - Patrón de crecimiento y color de las colonias (tope) de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* obtenidos de plantas de palma aceitera en Venezuela. **A.** Raquis 02; **B.** Fruto 27; **C.** Fruto 28; **D.** Fruto 22; **E.** Hoja 39; **F.** Raquis 07; **G.** Hoja 07; **H.** Hoja 38; **I.** Hoja 34.

TABLA 1 - Aislamientos del complejo de especies de *Colletotrichum gloeosporioides* utilizados en el estudio, procedentes del cultivo de palma aceitera de la Zona Sur del Lago de Maracaibo en Venezuela

Aislado monoconidial	Sitio de aislamiento	Número de accession GenBank	Diámetro de la colonia a los 6 días (mm)	Color de la colonia (tope)	Color de la colonia (reverso)	Tipo de micelio	CgInt/ITS4*	CaInt2/ITS4*
H01	Hoja	JQ417206	74,5	Blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H02	Hoja		72,0	Gris oliva y blanco	Gris oliva y blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H04	Hoja		87,5	Blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H05	Hoja		69,5	Gris oliva en el centro con borde blanco	Gris oliva y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H07	Hoja		76,0	Gris oliva y blanco	Gris oliva y blanco con acérvulos gris oscuro	Aéreo- algodonoso	+	-
H08	Hoja		84,0	Blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H09	Hoja		86,5	Blanco	Gris claro en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H10	Hoja		74,5	Amarillo pálido en el centro con borde blanco	Amarillo pálido	Subaéreo-plano	+	-
H12	Hoja		80,5	Gris oliva en el centro con borde blanco	Marrón oliva en el centro con borde gris oliva y blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H13	Hoja		82,5	Gris oliva y blanco	Marrón oliva en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H16	Hoja		66,0	Amarillo pálido en el centro con borde blanco	Amarillo pálido	Subaéreo-plano	+	-
H18	Hoja	JQ417204	59,0	Amarillo pálido en el centro con borde blanco	Amarillo pálido	Subaéreo-plano	+	-
H21	Hoja		80,0	Gris oliva en el centro con borde blanco	Gris oliva y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H23	Hoja		74,5	Blanco	Blanco con exudado naranja pálido	Aéreo- algodonoso	+	-
H24	Hoja	JQ417205	73,0	Gris claro en el centro con borde blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H25	Hoja		78,0	Gris claro en el centro con borde blanco	Gris claro en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H27	Hoja		74,5	Gris claro en el centro con borde blanco	Gris claro en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H28	Hoja	JQ417207	74,5	Blanco	Gris claro en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H29	Hoja		84,0	Gris claro en el centro con borde blanco	Gris oliva y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H34	Hoja		79,5	Gris claro y exudado naranja pálido en el centro con borde	Gris oliva y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H36	Hoja		77,5	Gris claro en el centro con borde blanco	Gris oliva y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-

cont.

cont.

Aislado monoconidial	Sitio de aislamiento	Número de accession GenBank	Diámetro de la colonia a los 6 días (mm)	Color de la colonia (tope)	Color de la colonia (reverso)	Tipo de micelio	CgInt/ITS4*	CaInt2/ITS4*
H37	Hoja		66,5	Amarillo pálido en el centro con borde blanco	Blanco	Subaéreo-plano	+	-
H38	Hoja		72,5	Gris claro y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Gris oliva y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H39	Hoja		77,5	Gris claro en el centro con borde blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
H40	Hoja		77,0	Blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
R02	Raquis	JQ417211	72,5	Naranja pálido en el centro con borde blanco	Naranja pálido en el centro con borde blanco	Subaéreo-plano	+	-
R05	Raquis	JQ417212	74,0	Gris claro en el centro con borde blanco	Gris claro y blanco con exudado naranja pálido	Aéreo- algodonoso	+	-
R07	Raquis		80,5	Gris claro y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Marrón oliva en el centro con borde gris oliva y blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
R09	Raquis		72,5	Gris oliva en el centro con borde blanco	Marrón oliva y exudado naranja pálido en el centro con borde gris oliva	Aéreo- algodonoso	+	-
R11	Raquis		72,0	Gris claro y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Gris claro y blanco con exudado naranja pálido	Aéreo- algodonoso	+	-
R13	Raquis		75,0	Blanco	Gris claro en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
R14	Raquis		75,0	Blanco en el centro con borde gris claro	Blanco con exudado naranja pálido y acérvulos gris oscuro	Aéreo- algodonoso	+	-
R15	Raquis		85,0	Gris oliva y blanco	Gris oliva y blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
R33	Raquis		72,0	Gris oliva y blanco	Gris oliva con exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
R34	Raquis		82,5	Gris claro y	Gris claro y	Aéreo- algodonoso	+	-
F01	Fruto		74,0	Blanco	Blanco con exudado naranja pálido y acérvulos gris oscuro	Aéreo- algodonoso	+	-
F07	Fruto		60,0	Blanco	Blanco con exudado naranja pálido y acérvulos gris oscuro	Aéreo- algodonoso	+	-
F08	Fruto		73,5	Naranja pálido en el centro con borde blanco	Blanco con exudado naranja pálido y acérvulos gris oscuro	Subaéreo-plano	+	-
F11	Fruto		81,5	Blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
F17	Fruto		78,5	Gris oliva en el centro con borde blanco	Gris oliva en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-

cont.

cont.

Aislado monoconidial	Sitio de aislamiento	Número de accession GenBank	Diámetro de la colonia a los 6 días (mm)	Color de la colonia (tope)	Color de la colonia (reverso)	Tipo de micelio	CgInt/ITS4*	CaInt2/ITS4*
F18	Fruto	JQ417209	76,5	Blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
F19	Fruto		73,0	Gris oliva y blanco	Gris oliva y exudado naranja pálido en el centro con borde blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
F21	Fruto	JQ417208	63,5	Amarillo pálido en el centro con borde blanco	Amarillo pálido en el centro con borde blanco	Subaéreo-plano	+	-
F22	Fruto		75,0	Blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
F23	Fruto		71,5	Naranja pálido en el centro con borde blanco	Blanco	Subaéreo-plano	+	-
F24	Fruto	JQ417210	78,0	Gris oliva en el centro con borde blanco	Gris oliva y blanco con acérvulos gris oscuro	Aéreo- algodonoso	+	-
F25	Fruto		77,5	Blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
F26	Fruto		68,5	Gris claro en el centro con borde blanco	Blanco	Aéreo- algodonoso	+	-
F27	Fruto		75,0	Amarillo vivo	Amarillo vivo	Subaéreo-plano	+	-
F28	Fruto	JQ417213	70,0	Amarillo pálido en el centro con borde blanco	Amarillo pálido en el centro con borde blanco	Subaéreo-plano	+	-

*Resultado de la amplificación con los cebadores para *Colletotrichum gloeosporioides* (CgInt/ITS4) y para *Colletotrichum acutatum* (CaInt2/ITS4): (+), positiva; (-), negativa.

El diámetro de las colonias de los 50 aislados en PDA después de 6 días de incubación en la oscuridad a 25°C, no fue significativamente diferente por sitio de aislamiento ($P=0,281$). En los aislados de hojas el diámetro alcanzado tuvo un rango de (59 - 87,5 mm) con una media de 76,06 mm; para raquis (72 - 85 mm) con una media de 76,1 mm y para fruto (60 - 81,5 mm) con una media de 73,06 mm (Tabla 1). No hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento diaria por sitio de aislamiento ($P=0,955$); así, para los aislados de hoja el crecimiento fue de 11,34 mm d⁻¹, raquis 11,35 mm d⁻¹ y fruto 10,84 mm d⁻¹.

Los colores evaluados siguiendo la nomenclatura propuesta por Kornerup & Wanscher (1978) fueron: blanco = -A1; gris claro = 1C1; gris oliva = 1-2-3D2; gris oscuro = 1F1; amarillo pálido = 3-4A3; amarillo vivo = 3A8; naranja pálido = 5-6A3; y marrón oliva = 4F3 (Figura 2). Se observó policromía en el tope y reverso de todas las colonias evaluadas; sin embargo, la característica color fue restrictiva para agrupar las colonias por sitio de aislamiento, debido a que el grupo fue muy heterogéneo (Tabla 1). En el 50% de los aislados predominaron los colores gris oliva, gris claro y gris oscuro, mientras el otro 50% de las colonias tuvieron coloraciones que van desde el blanco, naranja pálido, amarillo pálido, amarillo vivo y marrón oliva, independientemente del sitio de aislamiento. En algunas colonias se observó la presencia de acérvulos de color gris oscuro.

Las conidias producidas *in vitro* en los tres aislamientos seleccionados para la evaluación, se identificaron como nucleadas hialinas, rectas, cilíndricas

con extremos obtusos que se produjeron en masas de consistencia pegajosa de color naranja; así mismo se observó la presencia de acérvulos con setas; sin embargo, esta característica no fue objeto de medición en la investigación. Las dimensiones de las conidias fueron las siguientes: para el aislado H24 (10 x 5 a 17,5 x 7,5 µm) con media de 14,5 x 5,58 µm; aislado F28 (10 x 5 a 17,5 x 7,5 µm) con media de 13,16 x 5,5 µm y aislado R02 (12,5 x 5 a 17,5 x 7,5 µm) con media de 14,54 x 5,64 µm. Se detectaron diferencias significativas en las medias obtenidas para la longitud de las conidias de los tres aislamientos ($P=0,000$), no obstante en las medias del ancho de las conidias no hubo diferencia significativa ($P=0,739$). De estas observaciones morfológicas resultó evidente que las características macro y microscópicas evaluadas son distintivas de hongos del género *Colletotrichum*.

Amplificación por PCR y secuenciación de ITS

Los rangos de ADN obtenidos en la extracción, oscilaron entre 50 y 2545 ng µL⁻¹. La amplificación con los cebadores CgInt/ITS4 fue positiva para los 50 aislados de palma aceitera, generando fragmentos de ~450 pb (Figura 3), lo cual sugería que la identidad de los 50 aislados causantes de la antracnosis en el cultivo de palma aceitera en Venezuela, corresponden al complejo de especies de *C. gloeosporioides sensu lato*. En contraste, la reacción de PCR con los cebadores CaInt2 (específico para *C. acutatum sensu lato*) e ITS4, no amplificó ningún fragmento, pero sí en el control positivo, validándose su utilidad (Tabla 1; Figura 3).

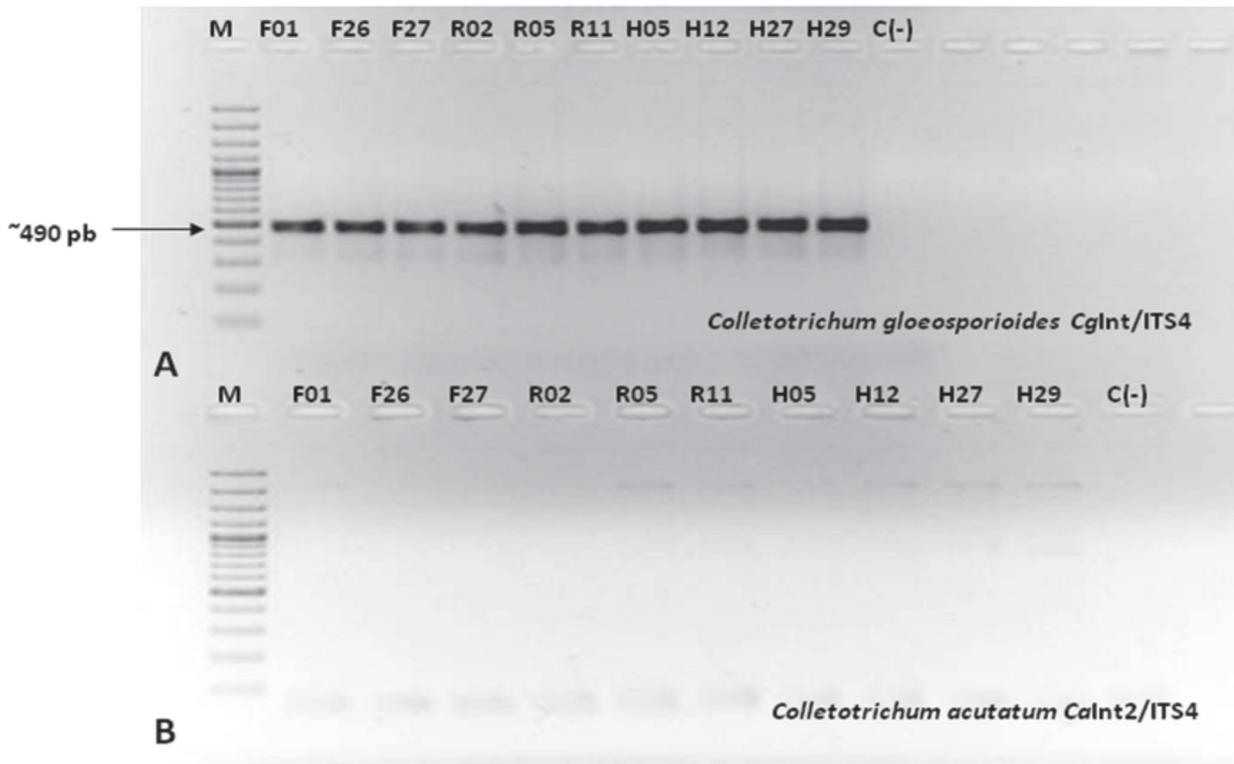


FIGURA 3 - PCR específica para la identificación de *Colletotrichum* sp. en 10 aislamientos obtenidos de palma aceitera. **A.** Amplificación positiva para *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* con los cebadores CgInt/ITS4 (~450pb); **B.** Amplificación negativa para *Colletotrichum acutatum sensu lato* con los cebadores CaInt2/ITS4. M: Marcador de 100 pb. C(-): Control negativo.

La amplificación de los productos de PCR de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr de los 50 aislados generaron un fragmento de aproximadamente ~600 pb con los cebadores ITS4 e ITS5; el control negativo no presentó banda, confirmando la validez de la prueba. El análisis BLAST de las secuencias, arrojó un porcentaje de similitud del 100% entre dichas secuencias y aquellas depositadas en GenBank para *C. gloeosporioides* y *G. cingulata*, obtenidas de otros hospederos y países del mundo. El análisis filogenético utilizó 551 posiciones, 471 de las cuales resultaron constantes, 17 variables pero no informativas y 63 informativas para el método de máxima parsimonia. El dendrograma generado presentó un índice de consistencia (CI) de 0,99, índice de retención (RI) de 0,99 y un índice de homoplasia (HI) de 0,01 y separó las especies de *Colletotrichum* bajo análisis en dos clados soportados por valores de bootstrap de 100%. El grupo I estuvo conformado por aislados de referencia del GenBank de *C. gloeosporioides sensu lato* o de su estado perfecto *Glomerella cingulata* obtenidos de *Litchi chinensis*, *Persea americana*, *Rubus fruticosus*, *Capsicum annum*, *Fragaria vesca*, *Annona muricata*, y los 10 aislados de palma aceitera de Venezuela, que fueron depositados en el GenBank bajo las accesiones JQ417204 a JQ417213 (Tabla 1). Adicionalmente, en este clado se alojaron las secuencias de los epítipos de *C. gloeosporioides* obtenidas de *Citrus*

sinensis, lo cual confirma la afinidad filogenético de los aislados de palma aceitera con el complejo de especies *C. gloeosporioides sensu lato*. Por otra parte, el grupo II estuvo conformado por tres aislamientos de *G. acutata* (An: *C. acutatum sensu lato*), incluyendo las secuencias de los paratipos IMI117619 e IMI117620 procedentes de *Carica papaya*. El aislado de *G. graminicola* de *Zea mays* se ubicó en posición externa a los dos clados (Figura 4).

RFLPs de ITS

Los patrones de restricción obtenidos con la totalidad de enzimas empleadas fueron idénticos en todos los 50 aislamientos del complejo de especies de *C. gloeosporioides sensu lato* para hoja, raquis y fruto, de tal forma que se puede inferir que la región ITS1, 5.8S e ITS2 tienen un alto grado de similitud en la población del complejo de especies de *C. gloeosporioides* en palma aceitera en Venezuela, observación que por lo demás, fue confirmada por el análisis de secuencias de los diez aislamientos seleccionados para tal fin (Figura 5).

RAPDs

A partir de las reacciones de RAPDs con los cinco cebadores fueron obtenidos 77 loci, 76 de ellos resultaron polimórficos. Los amplicones presentaron un rango de tamaños entre 250 y 3000 pb, siendo los cebadores OPE-03

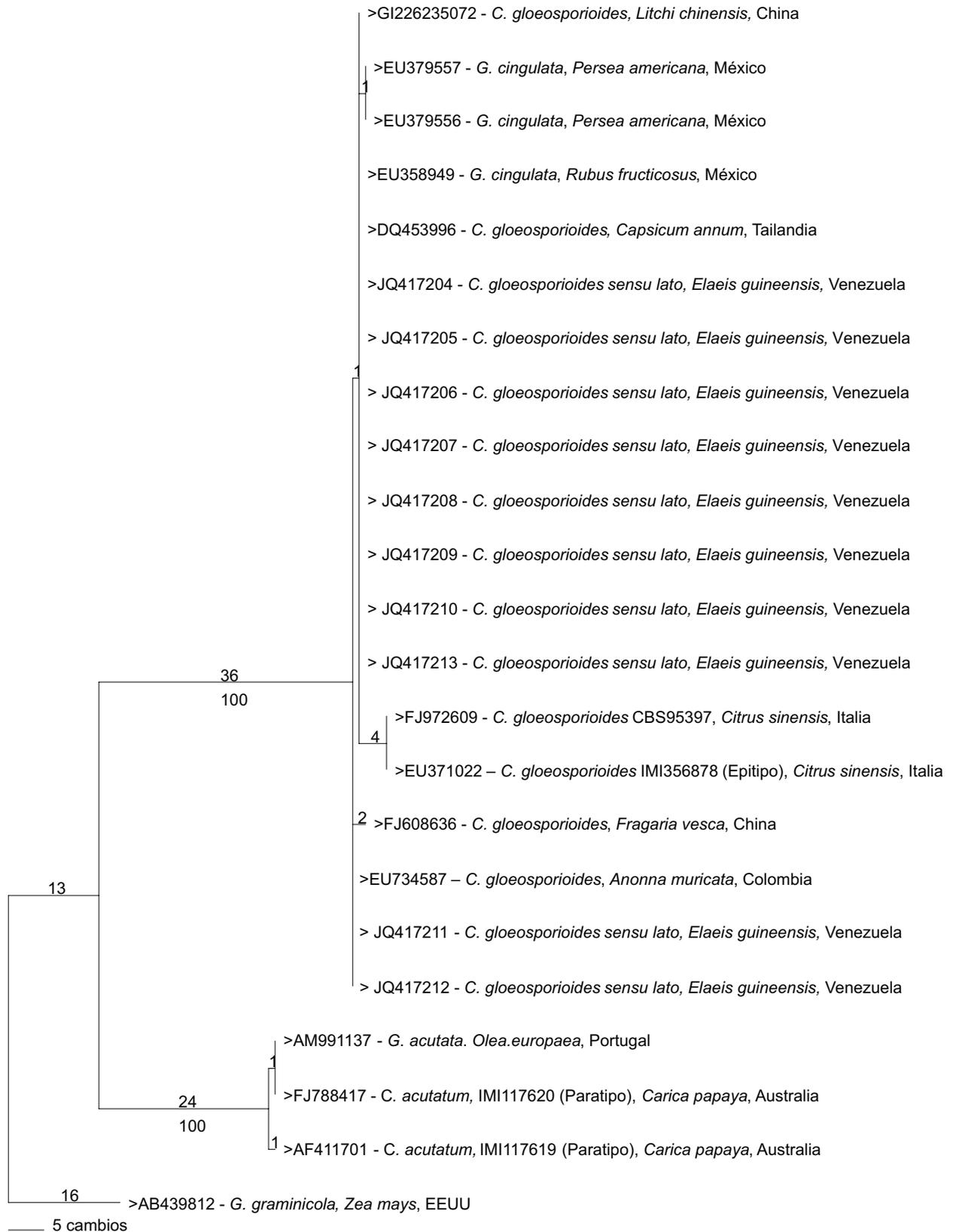


FIGURA 4 - Árbol filogenético basado en máxima parsimonia, con las secuencias de la región ITS del ADNr de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* de varios hospederos, incluyendo los 10 provenientes de palma aceitera en Venezuela. Los números sobre y bajo las ramas corresponden a los cambios y valores de bootstrap, respectivamente.

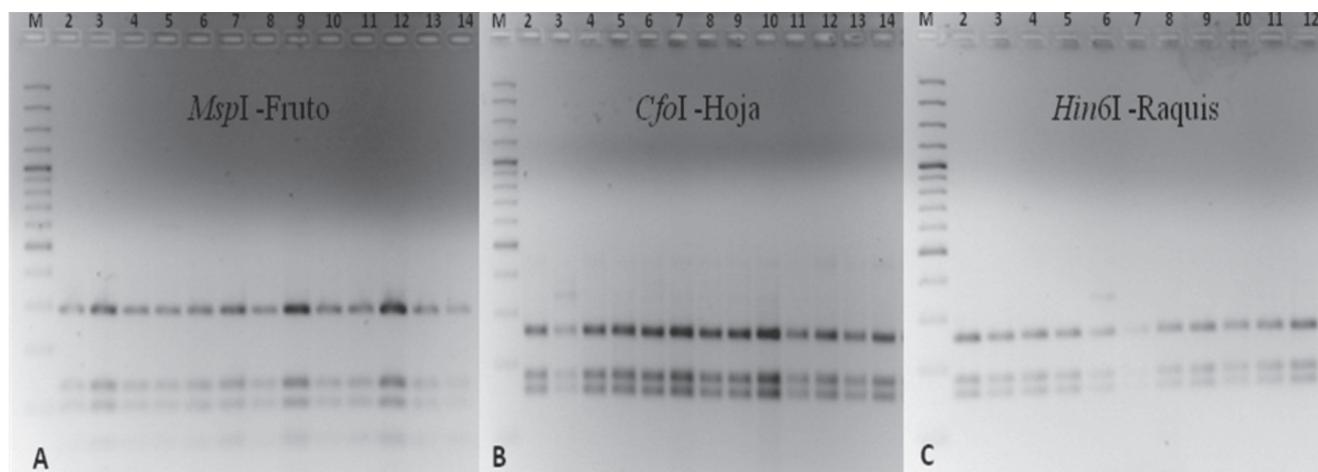


FIGURA 5 - Patrones de restricción de la región ITS del ADNr obtenidos con diferentes enzimas en aislados de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* en palma aceitera. **A.** *MspI* en aislados del fruto; **B.** *CfoI* en aislados de hoja; **C.** *Hin6I* en aislados de raquis.

y OPE-06 los que estuvieron representados por mayor número de *loci* (21 y 20), mientras que con los cebadores OPAN-15, E-19 y OPBA11 se amplificaron 14, 11 y 11 *loci*, respectivamente. El índice de Nei fue de 0,31 y el Shannon de 0,47. El dendrograma generado presentó cuatro grupos principales (grupos I, II, III y IV), siendo el clado II el mayoritario, con 38 de los aislados bajo análisis, mientras que los clados I, III y IV estuvieron conformados por sólo 7, 2 y 3 aislados, respectivamente. El análisis de agrupamiento indicó que el clado I está distantemente asociado a los otros grupos encontrados, con un valor de identidad de tan sólo 0,53, mientras que los clados II, III y IV hacen parte de una gran rama cuyos miembros comparten niveles de identidad superiores a 0,66. Con respecto al nivel de variación encontrado dentro de cada clado, es notable la alta uniformidad genética que presentan los miembros del clado II, los cuales corresponden al genotipo predominante del complejo de especies de *C. gloeosporioides* en palma aceitera en la región sur del Lago Maracaibo en Venezuela, mientras que al interior de los clados I y IV se presentaron aislamientos con distancias de hasta 0,15 (Figura 6). Con respecto a la procedencia de las muestras, no fue posible asociar un tejido de procedencia particular con los grupos genéticos identificados en la prueba de RAPD, lo cual sugiere que los mismos genotipos tienen la capacidad de afectar diferentes órganos en la palma aceitera.

Comprobación de la patogenicidad

La primera evaluación se realizó cuatro días después de la inoculación. Las 10 plantas inoculadas comenzaron a mostrar síntomas de antracnosis en los folíolos de las hojas y los raquis; sin embargo, no se detectaron los signos del patógeno. Se divisaron lesiones necróticas alargadas o concéntricas en los folíolos con

coloración marrón grisácea rodeada de un halo amarillo pálido. No hubo diferencia en el tamaño de las lesiones en ninguna de las plantas inoculadas. En los raquis las lesiones fueron irregulares sin bordes definidos, de consistencia acuosa y con coloración de marrón claro a oscuro en las fibras que lo componen. En las evaluaciones consecutivas, se observó el avance de las lesiones en los folíolos, percibiéndose depresiones en los tejidos con consistencia seca y coalescente con una coloración grisácea; en los raquis los tejidos infectados presentaron apariencia acuosa y blanda. Conforme la infección avanzaba, las áreas afectadas adquirieron una coloración entre bronce y café oscuro, de consistencia esponjosa y hundida (Figura 1G, H).

Durante las cuatro semanas de evaluación de la prueba en campo, no se detectó la aparición de los signos del patógeno presumiblemente debido a los cambios bruscos de temperatura y falta de precipitación durante la fase de evaluación. Las plantas del grupo control se mantuvieron sanas hasta el final de la prueba. En los frutos infectados los síntomas se hicieron visibles 24 h después de la inoculación, las lesiones fueron concéntricas con bordes regulares de color marrón claro al principio con aspecto húmedo y de consistencia blanda. A medida que la infección progresaba, las lesiones se tornaron color marrón oscuro con hundimiento del tejido y presencia de masas de conidias de color naranja pálido rodeado con un micelio aéreo de color blanco y gris oliva, que después de ocho días, colonizaron completamente los 32 frutos (Figura 1I). Los frutos del grupo control se mantuvieron sanos hasta el final de la prueba. El hongo *C. gloeosporioides sensu lato* fue re-aislado de los tejidos infectados experimentalmente y sus características morfológicas fueron similares a las registradas en los cultivos originales, cumpliéndose de esta manera los postulados de Koch.

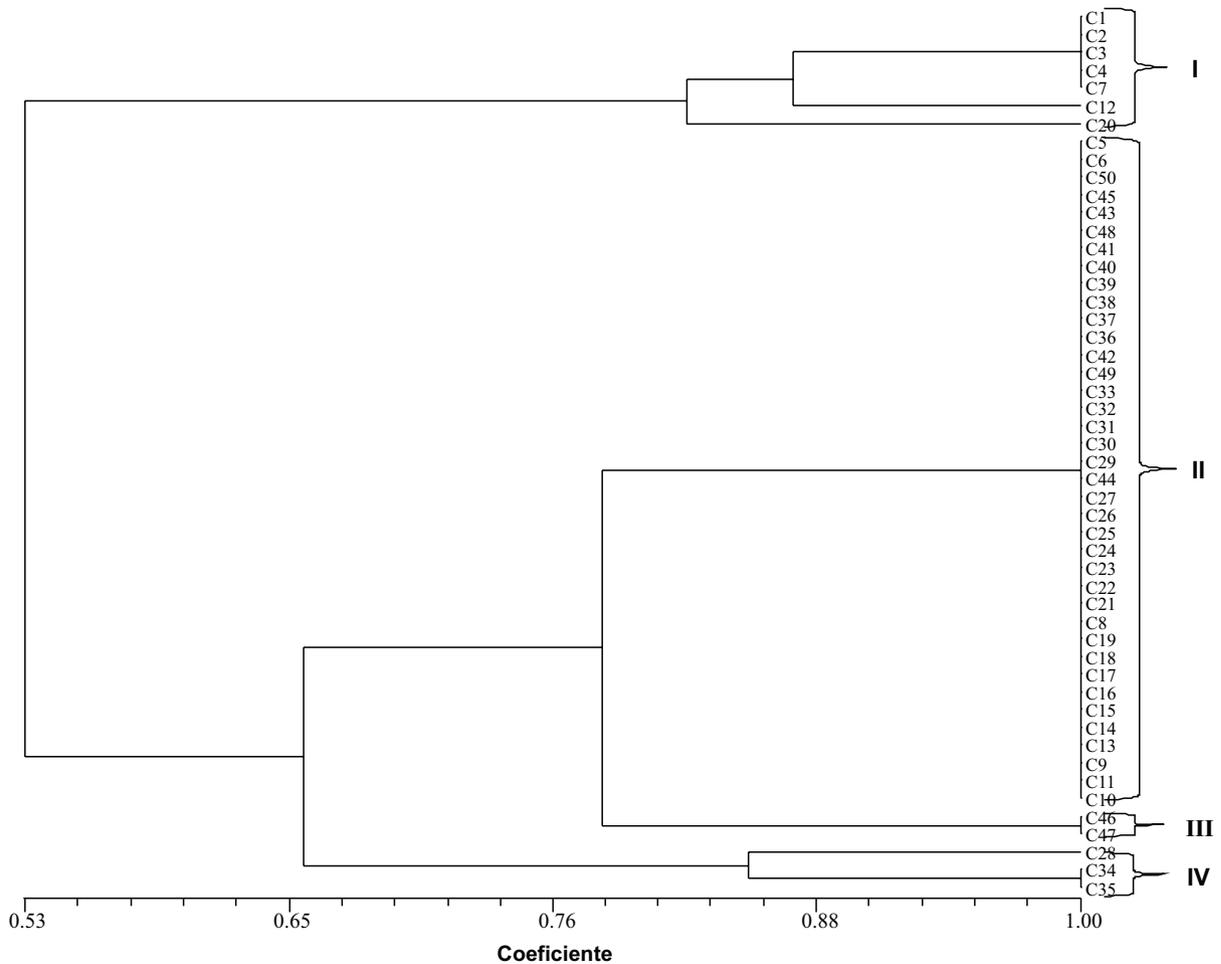


FIGURA 6 - Dendrograma UPGMA generado a partir del análisis de RAPDs con cinco cebadores en una población de 50 aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* obtenidos de palma aceitera en Venezuela. Los números romanos corresponden a los clados principales indicados en el texto.

DISCUSIÓN

En esta investigación se identificó al complejo de especies del hongo *C. gloeosporioides sensu lato*, anamorfo de *G. cingulata*, como el agente causal de la antracnosis en cultivos de palma aceitera de la zona sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. Tradicionalmente, la antracnosis de la palma aceitera puede ser causada por diferentes patógenos que incluyen *Botryodiplodia palmarum*, *Melanconium* sp. y *C. gloeosporioides* (Aderungboye, 1977), siendo ésta última la especie más frecuentemente reportada en plantas de vivero en América tropical (Salazar et al., 1992; Apuy-Medrano, 1997; Chinchilla & Escobar, 2007). Sin embargo, para nuestro conocimiento, en Venezuela no había reportes de antracnosis ocasionadas por especies de *Colletotrichum* afectando plantas adultas de palma aceitera, causando pudrición y pérdida de sus frutos y racimos.

C. gloeosporioides sensu lato ha sido registrado afectando un amplio rango de hospederos a nivel mundial,

incluyendo la antracnosis en palmas de diferentes especies (Cai et al., 2009; McKay et al., 2009). Uchida & Kadooka (1997) señalan que *C. gloeosporioides sensu lato* es responsable de las manchas en hojas de *Cyrtostachys renda*, palma ornamental de Hawái y una especie de *Colletotrichum* afectando diversas especies de palmas en Estados Unidos, incluyendo *Phoenix roebelenii*, *Caryota mitis*, *Washingtonia* sp., *Paurotis* sp. Oruade-Dimaro & Ekundayo (1992) reportaron por primera vez a este patógeno como el causante de manchas en las hojas de las plántulas de *Rhaphia hookeri*, una palma de importancia económica en Nigeria para la producción de alcoholes y papel a partir de sus tallos y hojas. En investigaciones más recientes, Carrington et al. (2001) identificaron a *C. gloeosporioides sensu lato* como el causante de la caída prematura de frutos de *Serenoa repens*, palma de gran importancia en la industria farmacéutica, mientras que Charchar et al. (2002) realizaron el primer reporte de *C. gloeosporioides sensu lato* causando pequeñas manchas circulares e irregulares

necróticas de color marrón-negro en las hojas de Gueroba (*Syagrus oleracea*), importante palma ornamental del Brasil. Finalmente, Nakamura et al. (2008) identificaron a *C. gloeosporioides sensu lato* como el responsable de manchas severas en la hojas de *Howea belmoreana*, palma ornamental cultivada en Japón.

La identificación morfológica basada en 50 aislados monoconidiales del hongo, condujo a su identificación en el género *Colletotrichum*, sin embargo las divergencias encontradas en su patrón de crecimiento, tipo de micelio, diámetro de las colonias, tasa de crecimiento, color de las colonias y forma y tamaño de las conidias, no permitía inequívocamente identificar dichos hongos en el complejo de especies *C. gloeosporioides* o *C. acutatum*, bajo los criterios planteados por Sutton (1992) en su revisión del género *Glomerella* y su anamorfo *Colletotrichum*, y por Freeman et al. (1998) en un estudio poblacional de ambas especies sobre diferentes hospedantes de importancia económica. Por lo anterior, se recurrió a la realización de pruebas moleculares, ampliamente validadas para discriminar entre estos complejos de especies (Freeman et al., 2000; Afanador-Kafuri et al., 2003; Photita et al., 2005, Cai et al., 2009), al emplear PCR con cebadores específicos y secuenciación de las regiones ITS del ADNr. Los resultados confirmaron la identificación de todos los aislados evaluados como pertenecientes al complejo de especies de *C. gloeosporioides*, mientras que el análisis filogenético indicó la ausencia de variación para la región ITS del ADNr en los diez aislados secuenciados, agrupándolos con cepas de esta especie obtenidas de varios hospedantes y diferentes regiones del mundo y presentando tan sólo cuatro cambios con respecto a las secuencias de los epitipos de *C. gloeosporioides sensu stricto*.

La uniformidad de las secuencias de los diez aislados seleccionados, nos condujo a evaluar si este patrón se repetía en los 50 aislados bajo estudio, para lo cual recurrimos a una evaluación indirecta de las secuencias mediante la técnica de RFLPs con seis endonucleasas, encontrándose que todos los aislados presentaron los mismos perfiles de restricción. Ya que este resultado refleja las diferencias en secuencia de una porción muy pequeña del genoma, se realizaron evaluaciones con marcadores RAPDs que exploran una mayor porción del genoma y permiten obtener índices globales de variación genética. En este caso, los resultados indicaron la presencia de diferentes subgrupos asociados al complejo de especies de *C. gloeosporioides* en palma aceitera en el sur del Lago de Maracaibo, aunque uno de los clados (II) presentó 38 de los 50 aislados bajo estudio, lo que conduce a plantear la presencia de un linaje genético que presenta un mayor grado de especificidad a palma aceitera; aunque esta hipótesis requiere ser verificada experimentalmente mediante pruebas de patogenicidad cruzada. Además de dicho genotipo, el análisis de RAPDs identificó al menos otros tres clados (I, III y IV), dos de los cuales (I y IV) presentan importantes niveles de variación

en su interior y cuya relación con otros hospedantes, está igualmente por determinarse. En función de los resultados presentados, se pudiera estar en presencia de otras especies dentro del complejo *C. gloeosporioides* no detectadas en el trabajo, dadas las limitaciones que para este género presentan las filogenias basadas exclusivamente en regiones ITS (Cai et al., 2009). Por esto, tal como lo indican Hyde et al. (2009) en su revisión taxonómica del género *Colletotrichum*, es necesario a futuro complementar dichos resultados con las secuenciaciones de β -tubulina, MAT1-2 (Genes de apareamiento) y GDPH (Glutaraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

Por otra parte, el dendrograma generado con la matriz binaria para RAPDs, no permite inferir que puede existir algún tipo de relación entre las características genotípicas de los aislamientos y los sitios de su procedencia en las plantas. Así por ejemplo, en el clado II se agruparon diferentes aislados independientemente de que fueron obtenidos de hoja, raquis y fruto. En el mundo se han realizado diversos trabajos tendientes a evaluar la estructura poblacional de especies de *Colletotrichum* mediante marcadores moleculares, encontrándose una gran diversidad de resultados que dificultan la generalización de un concepto sobre la variabilidad de estos hongos fitopatógenos (Munaut et al., 2002; Afanador-Kafuri et al., 2003; Lu et al., 2004; Ratanacherdchai et al., 2007; Jeleu et al., 2008). Así por ejemplo, Afanador-Kafuri et al. (2003) estudiaron las especies de *Colletotrichum* responsables de la antracnosis de las frutas en diversos cultivos de Colombia, incluyendo mango, papaya, tomate de árbol y varias pasifloráceas, encontrando que *C. acutatum sensu lato* correspondía al agente causal de esta enfermedad en tomate de árbol y que sus poblaciones se caracterizaban por presentar altos niveles de homogeneidad genética. Por el contrario, la especie causante de la antracnosis en mango y pasifloráceas en este país fue *C. gloeosporioides sensu lato*, pero al evaluar sus niveles de variación mediante diferentes marcadores moleculares, sus poblaciones eran característicamente divergentes, planteándose incluso que esto podría deberse a la posible presencia de la fase sexual peritecial del hongo, aunque esto no fue confirmado en dicha investigación. De esta forma, es posible concluir que la gran heterogeneidad morfológica y la complejidad genética de las especies de *Colletotrichum* y en particular de *C. gloeosporioides sensu lato*, puede ser explicada por la presencia de un complejo críptico de especies que incluye por lo menos a *C. fructicola*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. siamense*, *C. asianum*, *C. hymenocallidis*, *C. horii* y *C. kahawae* (Cai et al., 2009). En cualquier caso, los resultados encontrados en esta investigación ameritan continuar con el análisis de las especies que conforman este complejo asociado a antracnosis de palma aceitera y de la estructura poblacional de dichas especies en diferentes países cultivadores de palma aceitera.

Finalmente, las pruebas de patogenicidad permitieron corroborar la patogenicidad de aislados de *C. gloeosporioides sensu lato* en los tejidos de palma aceitera inoculados,

siendo posible su re-aislamiento en las inoculaciones realizadas en las plantas establecidas en campo y frutos, y cuyas colonias presentaron las mismas características que los cultivos originales, completando así los postulados de Koch. Los síntomas inducidos por el patógeno durante las pruebas de patogenicidad son indicativos de que este hongo podría generar una invasión intracelular hemibiotrófica y necrotrofica intramural subcuticular en palma aceitera, tal como lo reportan diferentes estudios de interacción hospedante patógeno realizados en el mundo (Diéguez et al., 2005; Münch et al., 2008), pero son necesarios estudios histopatológicos para comprobarlo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con apoyo económico de la Universidad de los Andes (Venezuela) y de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Se agradece a la Dra. Lucía Afanador-Kafuri por proporcionar las cepas de referencia de *C. acutatum sensu lato* y *C. gloeosporioides sensu lato*.

REFERENCIAS

- Aderungboye FO (1977) Diseases of the oil palm. International Journal of Pest Management 23:305-326.
- Afanador-Kafuri L (2011) Antracnosis de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth): Variabilidad del agente causante e identificación de fuentes de resistencia en germoplasma de *Rubus* spp. en Colombia. Tesis de PhD. Universidad Nacional de Colombia. Medellín Colombia.
- Afanador-Kafuri L, Minz D, Maymon M, Freeman S (2003) Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. Phytopathology 93:579-587.
- Apuy-Medrano M (1997) Etiología y manejo de la antracnosis en viveros de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq). Tesis de MSc. Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José Costa Rica.
- Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir BS, Waller J, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, Mckenzie EHC, Johnston PAR (2009) A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39:183-204.
- Carrere R (2006) Palma aceitera, de la cosmética al biodiesel. Publicación del Movimiento Mundial por los Bosques Tropicales. Montevideo Uruguay. pp. 9-19.
- Carrington ME, Roberts PD, Urs NVR, McGovern RJ, Seijo TE, Mullahey JJ (2001) Premature fruit drop in saw palmettos caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Disease 85:122-125.
- Charchar MJA, Anjos JRN, Akimoto AK (2002) First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on gueroaba in Brazil. Disease notes. Plant Disease 86:72.
- Chinchilla C, Escobar R (2007) El anillo rojo y otras enfermedades de la palma aceitera en centro y suramérica. ASD Oil Palm Papers 30:1-27.
- Diéguez-Urbeondo J, Förster H, Soto-Estrada A, Adaskaveg JE (2005) Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. Phytopathology 95:751-758.
- FONAIAP (1991) El cultivo de la palma aceitera. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, Venezuela. Serie Paquetes Tecnológicos N° 9.
- Freeman S, Katan T, Shabi E (1998) Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. Plant Disease 82:596-605.
- Freeman S, Minz D, Jurkevitch E, Maymon M, Shabi E (2000) Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. Phytopathology 90:608-614.
- Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, Damm U, Goodwin PH, Chen HL, Johnston PR, Jones EBG, Liu ZY, McKenzie EHC, Moriwaki J, Noireung P, Pennycook SR, Pfenning LH, Prihastuti H, Sato T, Shivas RG, Tan YP, Taylor PWJ, Weir BS, Yang YL, Zhang JZ (2009) *Colletotrichum* - names in current use. Fungal Diversity 39:147-183.
- Jelev Z, Bobev S, Minz D, Maymon M, Freeman S (2008) Characterization of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Bulgaria. Journal of Phytopathology 156:668-677.
- Kornerup A, Wanscher JH (1978) Methuen Handbook of Colour, 3th ed. London UK. Eyre Methuen.
- Labarca M, Sanabria N, Arcia A (2006) Patogenicidad de *Pestalotiopsis palmarum* Cooke, sobre plantas de vivero de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq). Revista Facultad Agronomía 23:417-426.
- Lu G, Cannon P, Reid A, Simmons C (2004) Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. Mycological Research 108:53-63.
- Martínez E, Hío J, Osorio J, Torres M (2009) Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. Agronomía Colombiana 27:211-218.
- McKay SF, Freeman S, Minz D, Maymon M, Sedgley M, Collins GC and Scott E (2009) Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of anthracnose of almond in Australia. Phytopathology 99:985-995.
- Meizhu D, Scharld CL, Nuckles EM, Vaillancourt LJ (2005) Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes. Mycologia 97:641-658.
- Mills PR, Sreenivasaprasad S, Brown AE (1992) Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. FEMS Microbiology Letters 98:137-144.
- Münch S, Lingner U, Floss DS, Ludwig N, Sauer N, Deising HB (2008) The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. Journal of Plant Physiology 165:41-51.
- Munaut F, Hamaide N, Maraite H (2002) Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. Mycological Research 106:579-593.
- Nakamura M, Hayasaki Y, Ryosho S, Iwai H (2008) Anthracnose of belmore sentry palm (*Howea belmoreana* Becc.) caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig et Saccardo. Journal of General Plant Pathology 74:86-87.

- Oruade-Dimaro EA, Ekundayo C (1992) Seedling blight disease of *Raphia hookeri* caused by *Glomerella cingulata* in Nigeria. *Principes* 36:41-44.
- Photita W, Taylor PWJ, Ford R, Hyde KD, Lumyong S (2005) Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* 18:117-133.
- Ratanacherdchai K, Wang HK, Lin FC, Soyong K (2007) RAPD analysis of *Colletotrichum* species causing chilli anthracnose disease in Thailand. *Journal of Agricultural Technology* 3:211-219.
- Salazar S, Mora O, Sosa M (1992) Enfermedades de la palma aceitera en la región centro occidental de Venezuela. *Fonaiap Divulga* N° 41.
- Silva B, Jaramillo S, Marín M (2009) Caracterización genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en las zonas productoras de papa de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Norte de Santander (Colombia). *Actualidades Biológicas* 31:5-20.
- Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown AE, Mills PR (1996) PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45:650-655.
- Sutton BC (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA, Jeger MJ (Eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK. CAB International. pp.1-26.
- Uchida J, Kadooka C (1997) *Colletotrichum* leaf spot of red sealing wax palm. *Plant Disease* 10:1-4.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego USA. Academic Press. pp. 315-322.

TPP 278b - Recibido 29 Marzo 2011 - Aceptado 19 Marzo 2012
Editor de Sección: Marcos A. Machado