

Diversidad genética y patogénica de los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* que infectan la leguminosa forrajera *Arachis pintoii*

S. Kelemu, F. Muñoz y M. X. Rodríguez*

Introducción

Arachis pintoii es una leguminosa nativa de Brasil (Valls y Simpson, 1993) que tiene un alto potencial para forraje y heno, así como cultivo de cobertura en plantaciones agrícolas. Se caracteriza por su buena producción de semillas debajo de la superficie del suelo (Kerridge, 1993). La enfermedad de la antracnosis, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, es cada vez más importante en Colombia debido a sus ataques en *A. pintoii*. El agente patógeno causa la muerte descendente de los estolones y manchas foliares que pueden destruir totalmente la planta.

La accesión *A. pintoii* CIAT 17434 es actualmente la más ampliamente distribuida en la zona tropical. Esta base genética estrecha lleva, quizás, el riesgo potencial asociado con las epidemias graves de una enfermedad. La densidad de las leguminosas forrajeras en las pasturas es generalmente mayor que la encontrada en los hábitat nativos, situación que crea un microambiente favorable para la aparición de enfermedades, entre ellas, la antracnosis. Esta enfermedad no es actualmente una limitante seria en *A. pintoii* en pasturas asociadas de gramíneas y leguminosas; no obstante, sí es una enfermedad que se observa a menudo en parcelas experimentales de sólo *A. pintoii* (S. Kelemu, observación personal). La práctica común de usar material de propagación vegetativo ha contribuido, probablemente, a la distribución del patógeno (Trutmann, 1994). Por ello es importante el estudio tanto de la diversidad genética como de la acción patogénica del agente causante de la antracnosis, cuando se prepara una estrategia eficaz para el manejo de la enfermedad.

En este estudio se evaluó la diversidad genética existente en aislamientos de *C. gloeosporioides* tomados de plantas de *A. pintoii* en cuatro regiones de Colombia: Caquetá (Amazonía), Centro de Investigaciones Carimagua (sabanas), Palmira y Popayán (zonas de laderas de altitud media y clima estacional seco). Para el efecto, se emplearon el ADN polimórfico aleatoriamente amplificado (RAPD) y el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) enzimática del ADN. Para determinar la variabilidad patogénica de los aislamientos se emplearon cuatro accesiones de *A. pintoii*.

Materiales y métodos

Aislamientos del hongo, material vegetal e inoculación de las plantas

Los aislamientos se recolectaron y se purificaron de tejidos infectados naturalmente, empleando los métodos estándar como los describen Kelemu et al. (1996). Estos aislamientos se usaron para inocular las accesiones *A. pintoii* CIAT 17434, 18744, 18748 y 22160. Como controles positivos de la patogenicidad del hongo se incluyeron aquellas accesiones de las cuales se hicieron los aislamientos. Como método de inoculación se utilizó el desarrollado por Subrahmanyam et al. (1983; 1985) para los patógenos foliares de maní (*A. hypogaea*), en el cual se emplearon tetrafolios separados de la planta en lugar de plantas enteras. Las preparaciones del inóculo se hicieron según el método propuesto por Kelemu et al. (1996). Las hojas, una vez inoculadas, se colocaron bajo condiciones de humedad relativa de 90%, a 25 °C y fotoperíodo de 12 h. La evaluación de la enfermedad se hizo 2 semanas después de las inoculaciones. Las pruebas de patogenicidad se repitieron, por lo menos, una vez para comprobar los resultados.

* Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia.

Para estudiar la posibilidad de ocurrencia de infectividad cruzada de *C. gloeosporioides*, se realizaron dos pruebas de inoculación cruzada de los aislamientos de este hongo en las accesiones de *A. pintoi* evaluadas y en la accesión *Stylosanthes guianensis* CIAT 2312, que es muy susceptible. Los aislamientos *A. pintoi* CIAT 16481, 16541, 16544 y 16590 y *S. guianensis* CIAT 16117, 16134, 16135 y 16162 fueron patogénicos en ambos hospederos.

Aislamientos de ADN y análisis RAPD y RFLP

El ADN fue extraído de todos los aislamientos que mostraban, por lo menos, patogenicidad en la accesión del hospedante original y de siete aislamientos no-patogénicos, tal como lo proponen Kelemu et al. (1999).

Para amplificar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) se emplearon nueve cebadores oligonucleótidos de 10 bases arbitrarias que fueron suministradas por Operon Technologies (Cuadro 1). Las condiciones de la amplificación y los análisis de la transferencia Southern fueron iguales a los descritos en Kelemu et al. (1999). Para el análisis de la transferencia Southern se empleó la sonda pCHB1 que contiene un elemento repetitivo aislado de *C. gloeosporioides* patogénica a *S. guianensis* (He et al., 1996).

Análisis estadístico de los datos RAPD

Las comparaciones de los perfiles de bandas de cada cebador se hicieron mediante la observación de la presencia (1) o la ausencia (0) de los productos del análisis RAPD que tenían el mismo tamaño. Las bandas del mismo tamaño fueron calificadas como idénticas. Para establecer el número posible de linajes genéticos, se hizo un análisis estadístico de la variación

Cuadro 1. Cebadores oligonucleótidos y códigos respectivos para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa.

Código	Secuencia (5'-...-3')
A-02	TGCCGAGCTG
A-03	AGTCAGCCAC
AJ-06	GTCGGAGTGG
AJ-09	ACGGCACGCA
AK-04	AGGGTTCGGTC
AK-09	AGGTCGGCGT
AK-19	TCGCAGCGAG
C-02	GTGAGGCGTC
D-03	GTCGCCGTCA

genética en todo el conjunto de datos, usando NTSYS-pc (Numerical Taxonomy System for Personal Computer). Para calcular el índice de semejanza de los datos cualitativos se utilizó el coeficiente de parejas sencillas y para el análisis de los conglomerados se empleó un programa UPGMA (unweighted pair-group method, arithmetic average) (Figura 1).

Para confirmar los resultados del dendrograma y con el fin de evaluar aún más el conjunto de datos, se hicieron los análisis que describen Kelemu et al. (1999) y se construyó un gráfico tridimensional empleando la plataforma giratoria del software JMP (SAS, 1995) para generar una representación visual de las asociaciones (Figura 2). Para probar repetitibilidad estadística de las asociaciones generadas, se hizo un análisis mediante la combinación del análisis de conglomerados con la técnica del muestreo múltiple aleatorio ('bootstrapping') (Efron y Gong, 1983). Esta medida de repetitibilidad se denominó Índice de Consistencia del Conglomerado (ICC). Los valores altos de ICC indican alta estabilidad del conglomerado. El ciclo de muestreo múltiple aleatorio y el análisis de conglomerados se repitieron 1000 veces.

Resultados y discusión

La antracnosis (ver Figura 3) crece cada vez más en importancia por sus ataques en *A. pintoi*.

De los 183 aislamientos estudiados, 84 fueron patogénicos, al menos en una accesión hospedante, mientras que los restantes no lo fueron. Se observaron reacciones diferenciales en las interacciones de aislamiento x genotipo hospedante, lo cual indica la existencia de una especialización patogénica en los aislamientos de *C. gloeosporioides* provenientes de *A. pintoi*.

En total fueron clasificadas 81 posiciones de bandas, y el análisis de los datos del RAPD reveló por lo menos cinco grupos donde los aislamientos de una región estaban distribuidos en todos los grupos.

En la Figura 1 se muestra el dendrograma de clasificación en grupos (A, B, C, D, E) de los 91 aislamientos probados (84 patogénicos y siete no patogénicos). Estos se separaron, en primer lugar, en dos grupos a un nivel de semejanza de 0.47: un grupo con 81 aislamientos y otro con 10. Este segundo grupo tenía un índice de semejanza entre 0.97 y 1.00. El grupo con 81 aislamientos estaba dividido en dos grupos con un índice de semejanza de 0.60. Uno de estos grupos era el B, que comprendía 47 aislamientos: 32 de Caquetá y 15 de Popayán, con un índice de

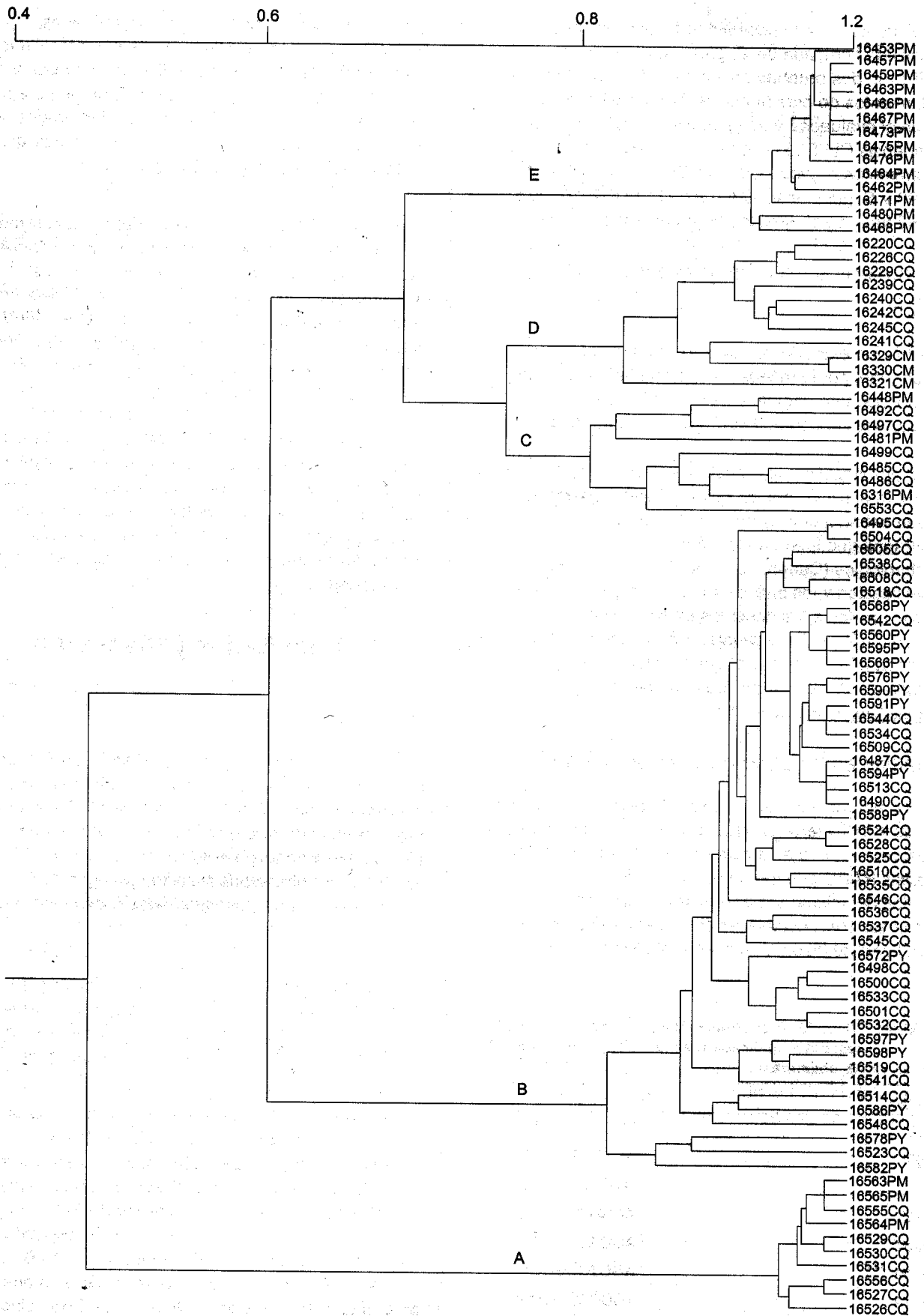


Figura 1: Dendrograma de los datos de RAPD provenientes de los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* que infectan *Arachis pintoi*. CQ = Caquetá, CM = Carimagua, PM = Palmira, PY = Popayán.

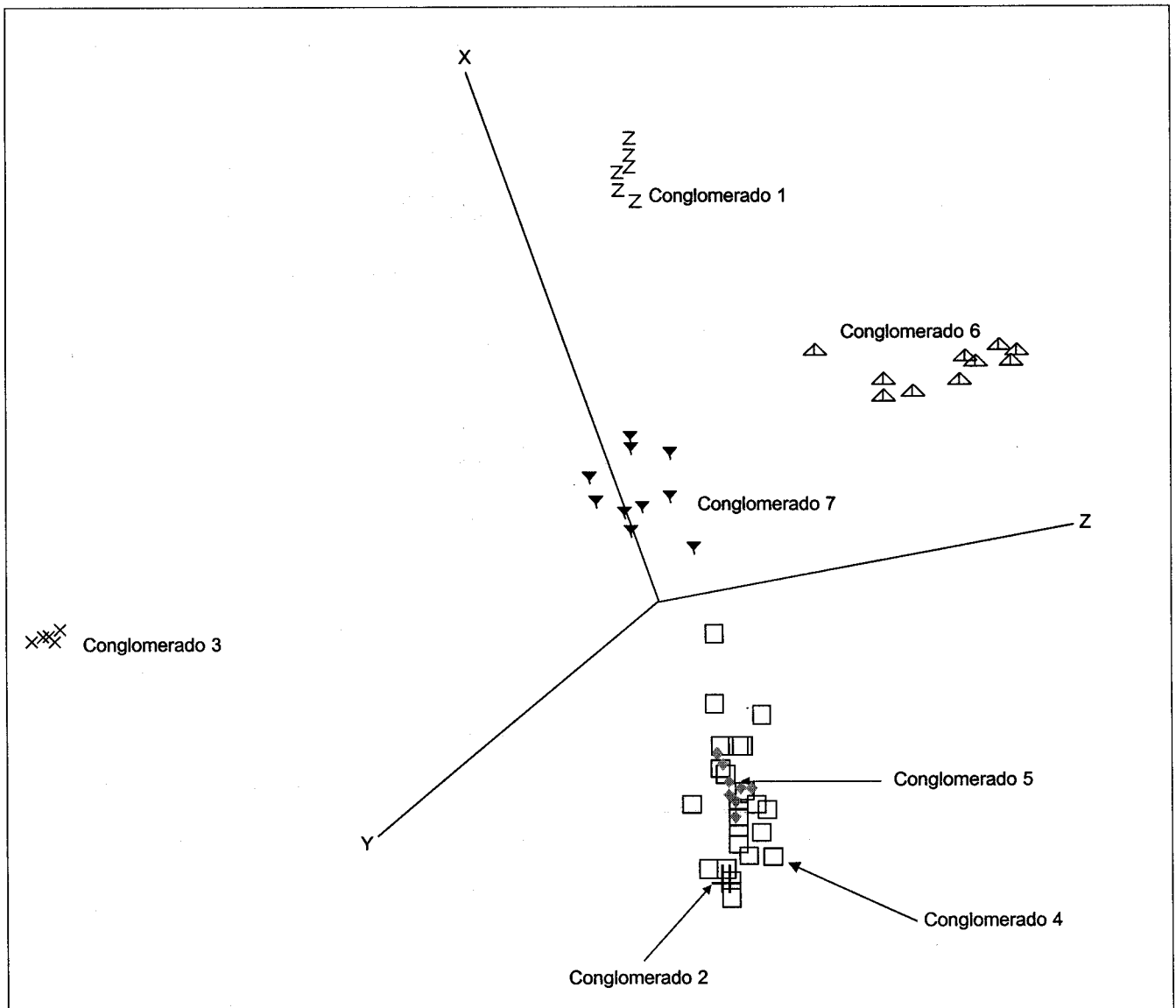


Figura 2. Distribución en conglomerados de 91 aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*, partiendo de los datos del RAPD que emplea la plataforma giratoria del software JMP (SAS, 1995).



Figura 3. Síntomas de antracnosis en *Arachis pintoi*.

semejanza entre 0.85 y 1.00; el otro grupo, de 34 aislamientos, se subdividió en dos grupos con un índice de semejanza de 0.70. El grupo E constaba de 14 aislamientos con un índice de semejanza entre 0.84 y 1.00; otro grupo de 20 aislamientos se separó a un nivel de 0.78 para formar el grupo C con 9 aislamientos y un índice de semejanza entre 0.82 y 0.96; y el grupo D con 11 aislamientos y un índice de semejanza entre 0.86 y 0.97.

Los aislamientos de plantas de *A. pintoi* provenientes del Caquetá aparecieron en todos los grupos, lo que indica que esta zona tiene aislamientos de alta diversidad genética. Los aislamientos de plantas provenientes de Popayán y Caquetá mostraron

un alto grado de semejanza, lo que indica que uno se originó del otro. El grupo E contenía los aislamientos de Palmira.

El análisis de conglomerados generó siete grupos (Figura 2), observándose una alta concordancia entre el dendrograma y el análisis respectivo (Cuadro 1). Los conglomerados 1, 3 y 6, que correspondían, respectivamente, a todos los aislamientos de Palmira, Caquetá y Palmira, y Caquetá y Carimagua tenían un alto ICC (Cuadro 2). El conglomerado 1 constaba de 14 aislamientos, el conglomerado 3 tenía siete aislamientos del Caquetá y tres de Palmira, y el conglomerado 6 tenía ocho aislamientos del Caquetá y tres de Carimagua. El conglomerado 7 constaba de seis aislamientos de Caquetá, tres de Palmira y uno de Popayán. Los 10 aislamientos del conglomerado 3 (con el ICC más alto) se originaron en Palmira y Caquetá, lo que sugiere la posibilidad de intercambios entre Caquetá y Palmira mediante material vegetativo.

Los resultados de RFLP revelaron que el ADN de sólo cinco de los 91 (CIAT 16453, 16485, 16486, 16576 y 16499) formaban híbridos con la sonda pCHB1 de ADN repetitivo (clonada de un aislamiento que era específico de *S. guianensis*). Es interesante notar que estos aislamientos también causaron síntomas de antracnosis en una accesión muy susceptible de *S. guianensis*. Los resultados de los estudios de infectividad cruzada indican que algunos aislamientos de *C. gloeosporioides* tienen capacidad para infectar tanto *Stylosanthes* como *Arachis*, ambos géneros importantes de leguminosas forrajeras tropicales. El agente patógeno que infecta *S. guianensis* es complejo y diverso, como lo revelaron los estudios sobre la diversidad genética y patogénica de los aislamientos de dicho agente (Kelemu et al., 1996; 1999). El presente

Cuadro 2. Concordancia de los grupos del dendrograma y de las asignaciones a conglomerados de los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*, y al Índice de Consistencia del Conglomerado (ICC).

Grupos del dendrograma	Identificación de los conglomerados	ICC ^a
A	3	1.00
B	2	0.29
	4	0
	5	0
C	7	0.28
D	6	0.72
E	1	0.93

a. Los valores altos del ICC indican la alta estabilidad del conglomerado.

estudio muestra también que la población del aislamiento que infecta *A. pinto* es similar, en complejidad y en diversidad, al que infecta *S. guianensis*.

Las pruebas de variabilidad patogénica revelaron que existen reacciones diferenciales expresadas en las interacciones de *C. gloeosporioides* x *A. pinto*. Esto indica que es posible diseñar un programa de fitomejoramiento que genere productos de *A. pinto* con resistencia general a varios aislamientos del agente patógeno.

Summary

Pathogenic variability of 183 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from forage *Arachis pinto* was determined on four CIAT accessions of *A. pinto* (17434, 18744, 18748, 22160) and the original accession from which each of the isolates was obtained. These isolates were collected from four locations in Colombia: Carimagua, Caquetá, Palmira, and Popayán. Pathogenic specialization was observed for the first time indicating the presence of physiologic races among these isolates on accessions of *A. pinto*. The genetic diversity of 91 of these isolates was measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Results showed that there were at least five lineages of *C. gloeosporioides* among the isolates studied. Detailed analysis of molecular data indicates that some isolates of the pathogen had probably been introduced from one location to another through vegetative materials. Caquetá area had the highest diversity of *C. gloeosporioides* isolates infecting this forage legume. Some isolates of *C. gloeosporioides* isolated from infected *A. pinto* are also pathogenic to *S. guianensis*, and some which originated from accessions of *S. guianensis* can infect *A. pinto*.

Referencias

- Efron, G. y Gong, F. 1983. A leisurely look at the bootstrap, the jackknife and cross-validation. *Am. Stat.* 37:35-48.
- He, C.; Nourse, J. P.; Kelemu, S.; Irwin, J. A. G.; y Manners, J. M. 1996. CgT1: A non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol. Gen. Genet.* 252:320-331.
- Kelemu, S.; Badel, J. L.; Moreno, C. X.; y Miles, J. 1996. Virulence spectrum of South American isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates on selected *Stylosanthes guianensis* genotypes. *Plant Dis.* 80:1355-1358.

- _____; Skinner, D.; Badel, J. L.; Moreno, C. X.; Rodríguez, M. X.; Fernández, C. D.; Charchar, M. J.; y Chakraborty, S. 1999. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 261-272.
- Kerridge, P. C. 1993. Future prospects for utilization and research in forage *Arachis*. En: Kerridge, P. y Hardy, B. (eds.). *Biology and agronomy of forage Arachis*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 199-206.
- SAS (Statistical Analysis System). 1995. SAS/JMP Statistical Discovery Software. Versión 3.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.
- Subrahmanyam, P.; Moss, J. P.; y Rao, V. R. 1983. Resistance to peanut rust in wild *Arachis* species. *Plant Dis.* 67:209-212.
- _____; _____; McDonald, D.; Subba-Rao, P. V.; y Rao, V. R. 1985. Resistance to leaf spot caused by *Cercosporidium personatum* in wild *Arachis* species. *Plant Dis.* 67:209-212.
- Trutmann, P. 1994. Diseases of tropical pasture plants in Central and South America. En: Lenné, L. y Trutmann, P. (eds.). *Diseases of tropical pasture plants*. CAB International, R.U. p. 292-314.
- Valls, J. F. y Simpson, C. E. 1993. Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. En: Kerridge, P. y Hardy, B. (eds.). *Biology and agronomy of forage Arachis*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 1-18.