

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Identificación morfológica y molecular de agente causal de antracnosis foliar de
***Anacardium excelsum* (Bertero & Balb. Ex Kunth) Skeels (Anacardiaceae)**

POR:

Ruth Angélica Rogers Leacock

Yaleskia Denise Valdés Hidalgo

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología con especialización en Microbiología y Parasitología.

Panamá, República de Panamá

2020



TRIBUNAL EXAMINADOR

TÍTULO:

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AGENTE CAUSAL DE
ANTRACNOSIS FOLIAR DE *ANACARDIUM EXCELSUM* (BERTERO & BALB. Ex.
KUNTH) SKEELS (ANACARDIACEAE)

POR:

RUTH ANGÉLICA ROGERS LEACOCK

8-889-419

YALESKIA DENISE VALDÉS HIDALGO

8-884-1164

Trabajo de graduación a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial
para optar por el título de Licenciatura en Microbiología y Parasitología.

Asesor: Dr. Luis C. Mejía

Jurados: Prof. Ariadna Bethancourt

Prof. Brenda Mayorga

AGRADECIMIENTOS

“Agradecemos a Dios por permitirnos adquirir las bases del conocimiento de esta importante carrera, Licenciatura en biología, y por permitirnos seguir adentrándonos cada vez más en la ciencia y en el fascinante reino fungi”.

Queremos agradecer a nuestro asesor principal, el Dr. Luis Mejía por recibarnos en su laboratorio y darnos la iniciativa y libertad de darle vida a nuestro proyecto. Por su paciencia y consejos, por su generosidad al brindarnos un espacio dentro de su equipo de laboratorio e insumos para cada una de las prácticas efectuadas. A su equipo de trabajo: Licda. Evangelina López, quien nos instruyó en cada uno de los procesos dentro de un laboratorio de biología molecular. Al Lic. Ariel Raschella y la Mtra. Marjorie Cedeño por guiarnos en los experimentos dentro del laboratorio y aconsejarnos respecto a metodologías a usar. Agradecemos que, al hablarnos de sus experiencias, nos compartieran cada uno de los sucesos, consejos e incidencias de forma tal que aquellas no fuera necesarias repetirlas.

Nuestra asesora Mtra. Ariadna Bethancourt, por ser la primera persona en abrirnos las puertas al maravilloso mundo de la micología. A motivarnos a profundizar en la importancia de los hongos y su impacto en los ecosistemas. A la Dra. Brenda de Mayorga por brindar su apoyo y conocimiento durante la redacción de este manuscrito.

A cada uno de nuestros profesores y familiares que de una u otra forma nos han motivado a llegar hasta aquí. Por sus consejos y constante guía en este arduo proceso.

A la Universidad de Panamá por ser la institución que nos llevó hacia la luz del conocimiento y darnos alojamiento en nuestros 5 años de formación académica.

Finalizamos agradeciendo al Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología AIP (INDICASAT-AIP) por abrirnos sus instalaciones para poder realizar cada uno de los experimentos. Por los seminarios científicos y explicaciones para cada proceso. Los doctores y colaboradores dentro del instituto que brindaron una mano ayuda al utilizar sus equipos.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	13
Generalidades del <i>Anacardium excelsum</i>	13
Enfermedades de plantas	16
Patología Vegetal: Estudio de las enfermedades en plantas	17
Hongos patógenos asociados al género <i>Anacardium</i>	19
Detección de patógeno asociado a una enfermedad	20
Identificación de patógenos	21
Estrategias de control	21
Justificación del estudio	27
Objetivo General	28
Objetivos Específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Sitio de Estudio.....	29
Colecta y Aislamiento del Patógeno	29
Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> , laboratorio	30
Prueba de patogenicidad <i>in vivo</i> , campo	32
Caracterización morfológica del patógeno	34

Extracción de ADN	35
Amplificación por PCR y secuenciación de ADN	36
Filogenia del patógeno	39
Pruebas de antagonismo	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Aislamiento del patógeno	44
Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	48
Pruebas de patogenicidad <i>in vivo</i>	53
Descripción morfológica del patógeno	55
Extracción y secuenciación de ADN	56
Análisis filogenético	67
Pruebas de antagonismo	69
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Individuo de <i>Anacardium excelsum</i> con síntomas de antracnosis foliar y objeto de este estudio.	27
Figura 2. Clasificación de hojas de <i>A. excelsum</i> en base a fases de desarrollo.	31
Figura 3. Mapa de loci ITS y β-tubulina con posición relativa de cebadores usados para amplificación de β-tubulina.	37
Figura 4. Diferentes tipos de lesiones foliares en base a su estado de desarrollo y ocurrencia en <i>A. excelsum</i>.....	45
Figura 5. Diferentes tipos de lesiones foliares en base a su estado de desarrollo y ocurrencia en <i>A. excelsum</i>.....	45
Figura 6. Morfoespecies de hogos aislados de lesiones de <i>A. excelsum</i>.....	47
Figura 7. Inoculaciones de hojas de <i>A. excelsum</i> con morfoespecies de hongos del código AE1.....	48
Figura 8. Inoculaciones de hojas de <i>A. excelsum</i> con morfoespecies de hongos del código AE2.....	49
Figura 9. Hojas controles para los experimentos de inoculación <i>in vitro</i> en cámara húmeda.	50
Figura 10. Lesiones ocasionadas por morfoespecie AE2.2.	50
Figura 11. Lesiones vistas bajo estereoscopio.	51
Figura 12. Reaislamiento de morfoespecie AE2.2.	52
Figura 13. Comparación de lesiones <i>in vivo</i>, obtenidas mediante inoculación de árbol experimental de <i>A. excelsum</i>, contra lesiones de árbol sujeto de estudio donde se observaron los síntomas originales.	53

Figura 14. Hojas control de prueba <i>in vivo</i>.	54
Figura 15. Reaislamiento del hongo patógeno de la prueba <i>in vivo</i>.	54
Figura 16. Crecimiento de <i>Colletotrichum tropicale</i>. AE2.2 en PDA.	55
Figura 17. Estructuras microscópicas de <i>Colletotrichum tropicale</i> AE2.2 en PDA.	58
Figura 18. Signos del patógeno en hojas.	59
Figura 19. Ciclo de vida general de especies de <i>Colletotrichum</i>.	66
Figura 20. Filogenia basada en análisis de máxima verosimilitud (“Maximum Likelihood”) de los loci ITS y β-tubulina para especies del complejo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>, usando <i>C. boninense</i> y <i>C. hippeastri</i> como grupo externo.	68
Figura 21. Crecimiento de <i>C. tropicale</i> AE2.2 en presencia de hongos endófitos selectos.	72
Figura 22. Interacciones <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum tropicale</i> AE2.2 contra hongos endófitos selectos.	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cebadores usados en el estudio.	36
Cuadro 2. Reactivos usados en las PCRs.....	37
Cuadro 3. Secuencias de ADN de especímenes tipo del género <i>Colletotrichum</i> obtenidas de la base de datos GenBank® y utilizadas en análisis filogenético.	40
Cuadro 4. Concentración y pureza de extractos de ADN.	61
Cuadro 5. Comparación de cepas hongos aislados de lesiones de hoja basado en similitud de secuencias ITS.....	62
Cuadro 6. Resultado de comparación de secuencias de ADN del locus <i>tef1-α</i> de morfoespecie AE2.2 contra secuencias de ADN en la base de datos GenBank®.....	64
Cuadro 7. Mediciones de interacciones al quinto día.....	70

RESUMEN

En el año 2016 se observaron síntomas de antracnosis en hojas de un individuo de árbol tropical *Anacardium excelsum* (Anacardiaceae), ubicado en el Campus Dr. Octavio Méndez Pereira de la Universidad de Panamá, en Ciudad de Panamá. Estos síntomas y su agente causal no estaban descritos en la literatura, lo cual motivó el presente trabajo de investigación. Esta tesis consistió en identificar el agente causal de los síntomas observados. Se hizo aislamiento de hongos a partir de lesiones, a los cuales se le asignaron códigos de cepas, y luego se realizaron pruebas de patogenicidad a través de inóculos de micelio y aspersión de conidias con cada uno de los hongos aislados. Una de las cepas aisladas (AE2.2) produjo síntomas similares a los observados en hojas de *A. excelsum* en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Se hicieron observaciones y mediciones de estructuras de reproducción del hongo patogénico, el cual se caracterizó por producir conidias sub-cilíndricas con bordes redondeados, de 11,9 – 15,4 μm de largo x 4,5 – 5,2 μm de ancho. Con el propósito de lograr una identificación molecular de las cepas aisladas se generaron secuencias para el locus ITS de todas las cepas aisladas. Basado en la secuencia ITS y morfología de conidias se pudo determinar que el hongo causante de los síntomas provenía del género *Colletotrichum* y luego se procedió a secuenciar dos genes más con el objetivo de obtener su posición filogenética precisa. Se generó una filogenia multilocus (ITS, β -*tubulina*) basada en análisis de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) lo cual permitió la identificación del agente causal como *C. tropicale*, un hongo que ha sido aislado frecuentemente como endófito y algunas veces como patógeno de árboles tropicales. Finalmente, se realizaron cultivos duales de *C. tropicale* con hongos endófitos de una colección de aislados de plantas tropicales y se identificaron algunas cepas que limitan el crecimiento de este hongo *in vitro*.

Palabras clave: antracnosis, análisis filogenético multilocus, ITS, *β -tubulina*, *tef1- α* , complejo de especies, endófito, antagonismo, *Anacardium*.

ABSTRACT

In 2016 anthracnose symptoms were observed on the leaves of an individual of the tropical tree *Anacardium excelsum*, located at the Dr. Octavio Méndez Pereira Campus of the University of Panama, Panama City. These symptoms and their causative agent were, neither reported nor described in the literature, which motivated the research work presented here. This thesis consisted of identifying the causal agent of the observed symptoms. Isolation of fungi was made from lesions, to which strain codes were assigned, and then pathogenicity tests were performed through mycelium inocula and conidia spraying with each of the isolated fungi.

One of the isolated strains (AE2.2) produced symptoms similar to those observed in *A. excelsum* leaves, both *in vitro* and *in vivo*. Observations and measurements were made of the reproductive structures of the pathogenic fungus, which produced conidia of 11.9 - 15.4 μm long x 4.5 - 5.2 μm wide of sub-cylindrical shape with rounded ends. To achieve a molecular identification of the isolated strains, sequences were generated for the ITS locus of all the isolated strains. Based on the ITS sequence and morphology of conidia, it was possible to determine that the fungus causing the symptoms belongs to the genus *Colletotrichum*; then, two more genes were sequenced to obtain their precise phylogenetic position. A multilocus phylogeny (ITS, β -*tubulin*) was generated based on maximum likelihood analysis (RAxML), which indicated that the causative agent was *C. tropicale*, a fungus that has been frequently isolated as an endophyte and sometimes as a pathogen from tropical trees. Finally, dual cultures of *C. tropicale* and fungal endophytes of a collection isolated from tropical plants were made, and some strains that limits the growth of this fungus *in vitro* were identified.

Key words: anthracnosis, multilocus phylogenetic analysis, ITS, *β -tubulin*, *tef1- α* , species complex, endophyte, antagonism, *Anacardium*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del *Anacardium excelsum* (Anacardiaceae)

La familia Anacardiaceae (familia del anacardo) se encuentra en el registro fósil desde el Paleoceno hace 65 a 55 millones de años atrás (Al-Saghir 2009). La familia Anacardiaceae está constituida por unos 71 a 80 géneros entre árboles, arbustos y escasas lianas, y por un total de 800 especies (Pérez-Lara, et al., 2017). Las especies de Anacardiaceae se distribuyen dentro de las regiones tropicales y subtropicales, y algunas ocurren en zonas templadas (Schulze-Kaysers, et al., 2015). Las especies de Anacardiaceae presentan diversas características morfológicas distintivas, pero de manera general se pueden diferenciar por presentar hojas perennes o caducas, alternas en su mayoría e imparipinadas con foliolos opuestos. Algunas hojas pueden ser simples o trifoliadas y casi todas poseen estípulas. Sus márgenes pueden ser enteros dentados, crenados o serrados. Con inflorescencias en su mayoría axilares y muy ramificadas (S.K. Pell et al., 2011).

Esta familia se divide en dos subfamilias Anacardioideae y Spondioideae (Pell 2004). En Panamá, se encuentran 4 especies nativas: *Anacardium excelsum*, *Astronium graveolens*, *Camptosperma panamense* y *Spondias mombin* (Carrasquilla R. 2008). Adicionalmente se encuentran en el país 20 especies introducidas: *Anacardium occidentale*, *Astronium conzattii*, *Mangifera indica*, *Mauria glauca*, *Mauria heterophylla*, *Mosquitoxylum jamaicense*, *Ochoterena colombiana*, *Schinus terebinthifolius*, *Spondias cytherea*, *Spondias dulcis* entre otros.

Anacardium excelsum (Bertero & Balb.) Skeels se conoce en América Latina con diversos nombres que incluyen Espavé o Pinuwala en Panamá/ Guna Yala, Caracolí en Colombia, Mijuguo en Venezuela, y Rabito en Costa Rica. Los árboles de *A. excelsum* llegan a medir hasta 40 m de alto, tienen hojas simples, alternas, de 14 – 31 cm de largo y de 5 – 12 cm de ancho (Carrasquilla R. 2008). Estos árboles suelen encontrarse en áreas de tierras bajas con mediana elevación, desde clima seco a húmedo o muy húmedo. Habitan en bordes de ríos y quebradas, adaptándose muy bien en suelos bien drenados (Ambiente, Energía, and Remotos 2007). En Panamá, se ha registrado en todas las provincias y comarcas.

Anacardium excelsum es utilizado en Centroamérica en carpintería general, ensambladura, formaleas para la construcción de casas, como también para la elaboración de canoas, botes, monturas de caballo, artesanías, entre otras. Esto es debido a que esta madera se trabaja fácilmente (Chízmár Fernández 2009). Posee gran importancia agroforestal ya que ayuda al control de erosión y protección de cauces fluviales. Su fruto es consumido en Nicaragua y Panamá, en este último país por los indígenas de la provincia de Darién (Chízmár Fernández 2009). En la Comarca Ngäbe lo utilizan para la construcción de sus viviendas y los Gunas para sistemas agroforestales ya que contribuye en la disminución de la erosión del suelo (Ambiente, Energía, and Remotos 2007). Esta especie también sirve de alimento para los animales, siendo estos los principales dispersores de sus semillas: murciélagos (*Artibeus* spp.), coatíes (*Nasua narica*) y monos (*Alouatta palliata*). La semilla puede ser consumida por el ser humano, pero únicamente cocida, ya que pueden resultar tóxicas debido al aceite cardol que se encuentra en la mayoría de las especies de la familia Anacardiaceae y que es utilizado para la fabricación de plásticos e insecticidas (Chízmár et al., 2009). Los

productores de nueces de *A. occidentale* (marañón) combinan las semillas de este con las semillas de *A. excelsum* para ahorrar costos por el similar sabor que poseen.

1.2. Enfermedades de plantas

Para que se produzca una enfermedad en las plantas deben interactuar por lo menos tres componentes: la planta hospedante, el patógeno, y condiciones ambientales que favorezcan la enfermedad. Si entran en contacto el patógeno y la planta, pero, las condiciones ambientales no son favorables puede que no se produzca enfermedad alguna en la planta hospedante, ya que el patógeno no puede colonizar la planta. Cada uno de los tres componentes muestra una considerable variabilidad y cuando alguno de ellos cambia, se puede producir variabilidad en el grado de intensidad de la enfermedad dentro de cada planta y dentro de toda una población vegetal. La interacción de estos tres componentes de las enfermedades se conoce como el triángulo de las enfermedades, cada lado del triángulo representa uno de los tres componentes y el tamaño de cada lado es proporcional a la suma total de las características de cada componente que favorece a la enfermedad (Agrios 2005). Las enfermedades de plantas pueden ser causadas por organismos patógenos y por factores del ambiente físico (Agrios 2005). Para que el patógeno se establezca en la planta debe cumplir con ciertas etapas cruciales: unirse a la superficie de la planta, germinar (en el caso de hongos), formar estructuras de infección, penetrar y colonizar el tejido.

La reacción de una planta afectada por un agente patogénico que ocasiona una enfermedad se propaga produciendo cambios histológicos que se hacen notables mostrando los síntomas de la enfermedad. A causa del patógeno, las células y tejidos se debilitan o destruyen, reduciendo o anulando la capacidad que tiene de llevar a cabo sus funciones. Esto se da ya

que absorben de forma continua el alimento de las células, alterando o inhibiendo el metabolismo de estas debido a la secreción de toxinas, enzimas o sustancias reguladoras del crecimiento y también bloqueando el paso de nutrientes, minerales y agua a través del sistema vascular.

El criterio más útil en la clasificación de una enfermedad es el tipo de agente patogénico que la ocasiona, por ejemplo, bacterias, hongos, nematodos, y virus. También suelen clasificarse de acuerdo al órgano afectado (tallo, raíz, hoja, frutos), al tipo de planta afectada (cultivos mayores, hortaliza, árboles frutales, árboles de bosque, césped, plantas ornamentales) y según sus síntomas (cancros, marchitamiento, manchas foliares, royas, carbonos, mosaicos, antracnosis) (Agrios 2005).

La infección del patógeno en las hojas se manifiesta a través de manchas foliares (antracnosis), tizones o mosaicos, afectando los procesos de fotosíntesis y respiración, y en las flores y frutos interfiere con la reproducción, afectando el desarrollo de nuevas plantas.

La antracnosis es un síntoma de enfermedad causada por hongos en las plantas, característica de zonas calurosas y húmedas. Se considera de gran importancia a nivel mundial (Maeda and Nelson 2014) y se presenta afectando diversos tipos de plantas, desde árboles hasta hierbas. Los síntomas y agresividad dependerán de la especie de planta afectada y pueden presentarse en frutos, tallos, hojas y raíces, en individuos debilitados o con síntomas de estrés.

1.3. Estudio de las enfermedades de plantas, fitopatología

Desde el siglo pasado la fitopatología ha presentado un crecimiento exponencial como ciencia. En el siglo XVIII se atribuyó que las enfermedades de algunas plantas eran causadas por insectos y más adelante se postuló por primera vez la presencia de agentes microscópicos.

La identificación de la primera enfermedad ocasionada por hongos se dio en el bulbo de la flor de azafrán, *Crocus sativus* en 1728 (Egerton 2008), y esto abrió el camino a nuevos agentes causales de enfermedades en las plantas. Gracias a los avances en la ciencia, se ha incrementado el estudio de la genética y fisiología de las enfermedades de las plantas y constantemente se producen nuevos compuestos para combatir estas enfermedades. Una de las ramas de la fitopatología es el estudio de los hongos patógenos, que, usando técnicas microbiológicas básicas y conocimientos de botánica, micología, fisiología vegetal, genética, bioquímica, horticultura, química, entre otras ramas de la ciencia, ayudan a dar con el agente causal de las enfermedades que afectan a las plantas (Agrios 2005). Las interacciones que se dan entre plantas y hongos se han clasificado como patogénicas, parasitarias, comensalitas o mutualistas, sin embargo, es difícil identificar ejemplos claros de relación planta-hongo en la naturaleza que se ajusten completamente a estas definiciones (Newton et al., 2010; De Silva et al., 2017).

Los hongos son organismos que cumplen funciones importantes en el desarrollo de la vida en el planeta. Sin embargo, dentro de este reino también se encuentra la mayor cantidad de agentes que causan enfermedades devastadoras a las plantas, se estima que aproximadamente más de 8,000 especies (Agrios 2005).

La mayoría de los hongos fitopatógenos presentan gran variabilidad de interacciones con su hospedero, cambiando su relación en diferentes etapas de su ciclo de vida. Dependiendo de la madurez fisiológica y resistencia del hospedero, del ambiente y genes de virulencia asociados del patógeno (Delaye, García-Guzmán, and Heil 2013; Newton et al., 2010; Stergiopoulos and Gordon 2014; Stergiopoulos and de Wit 2009).

Los hongos fitopatógenos de mayor importancia varían según las prioridades científicas y económicas de una región geográfica a otra (Juárez-Beccerra, Sosa-Morales, and López-

Malo 2010). Dean y colaboradores (2012) por lo tanto consideraron entre los diez hongos patógenos más importantes a: “*Magnaporthe oryzae* (añublo del arroz), *Botrytis cinerea* (podredumbre gris), *Puccinia* spp. (óxido negro; chocolate o amarillo), *Fusarium graminearum* (tizón de la cabeza), *Fusarium oxysporum* (enfermedad de Panamá), *Blumeria graminis* (mildiu del trigo), *Mycosphaella graminicola* (septoriosis de la hoja del trigo), *Colletotrichum* spp. (antracnosis y podredumbre poscosecha), *Ustilago maydis* (tizón del maíz) y *Melampsora lini* (óxido de lino).”

1.4. Hongos patógenos asociados al género *Anacardium*

Dentro del género *Anacardium* se han publicado múltiples estudios donde se reportan hongos patógenos de este género, tales como: *Lasiodiplodia theobromae* (Muniz et al. 2011), *Oidium anacardii* (Waller et al. 1992), *Botrytis cinerea* (Wonni et al. 2017), *Curvularia lunata* (Freire et al. 2002), *Fusarium oxysporum* (Khatoon et al. 2017), *Pestalotia heterocornis* (Wonni et al. 2017), *Phomopsis anacardii* (Pérez et al. 2005) y diversos más. Sin embargo, se le ha atribuido al *A. excelsum* la característica de ser un árbol cuya durabilidad natural es buena frente a infecciones por hongos y moderadamente resistente a termitas (BioMuseo 2011).

Anacardium occidentale, conocida en Panamá como marañón es la especie sobre la cual se reportan más estudios respecto a enfermedades y plagas que le atacan, ya que se cultiva en más de 32 países del mundo. Este árbol es la fuente principal de nuez de anacardo y se ha informado que más de 12 enfermedades afectan a esta especie en todo el mundo. Enfermedades tales como antracnosis, tizón foliar, podredumbre de la fruta, gomosis de ramas y troncos, entre otras, siendo éstas la principal causa de daños severos en los países

productores de anacardo (Wonni et al. 2017). En el pasado reciente las enfermedades de *A. occidentale* habían sido consideradas de menor importancia, hoy día se le considera importante a algunas de ellas ya que causan grandes pérdidas considerables en las plantaciones de anacardo (Khatoon, Mohapatra, and Satapathy 2017). En la actualidad es un árbol que se enferma con frecuencia, que poco produce frutos en Panamá y se ha descrito que presenta una muerte descendente ya que el microorganismo patógeno inicia atacando en la copa del árbol y termina colonizando a la raíz, estos síntomas han sido observados en el Pacífico de Panamá, Chiriquí, Veraguas, Los Santos y Coclé, la enfermedad tiene una distribución muy alta en todo el país (Quintero, 2017).

1.5. Identificación de agente causal de una enfermedad

Para saber qué organismo patógeno es responsable de los síntomas de enfermedad de una planta, es necesario hacer pruebas de patogenicidad, algo conocido también como “los postulados de Koch”. Esto se realiza llevando a cabo una serie de pasos y requisitos indispensables para demostrar la patogenicidad de un microorganismo, con el fin de identificar la enfermedad desconocida, siendo estos: 1) examinar la planta enferma, con síntomas, para encontrar signos del potencial patógeno asociado, recíprocamente la enfermedad no debe manifestarse sin que el organismo patógeno no esté presente; 2) el agente patógeno se debe aislar en medio de cultivo (si es cultivable) para estudiar y describir sus características; 3) se debe tomar una planta sana de la misma especie e inocular *in vivo* o *in vitro* el agente aislado y deberán reproducirse los síntomas característicos de la enfermedad; 4) al efectuar el reaislamiento a partir de los tejidos inoculados con el agente aislado, éste debe ser idéntico al que se aisló originalmente. En caso de que los postulados

de Koch se cumplan, se tendrá la evidencia de que el agente aislado es el que causa la enfermedad.

1.6. Identificación de patógenos

Uno de los requerimientos más importante para manejar una enfermedad es la identificación del agente causal en el menor tiempo posible y de forma fiable para minimizar los daños que producen.

En los laboratorios de fitopatología era muy difícil hasta hace poco la detección de algunos microorganismos por métodos clásicos de diagnóstico. El desarrollo de las técnicas moleculares ha facilitado la detección, categorización, e identificación de microorganismos patógenos siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una de las técnicas más utilizadas, mientras que la secuenciación de alto rendimiento se perfila como una técnica de gran aplicabilidad en el futuro (Palomino-Camargo and González-Muñoz 2014).

Las aplicaciones de la PCR deben su éxito a la sencillez teórica y rapidez en su ejecución. El poder aplicar con garantías técnicas moleculares suponen una enorme ganancia en tiempo que beneficia el control de la enfermedad (Aguín et al. 2001), y en el caso de la PCR se puede identificar a un patógeno a través de la amplificación de una región específica del genoma del organismo patógeno, en menos de tres horas.

1.7. Estrategias de control

Para el control de las enfermedades de las plantas se usan diversas estrategias, que buscan proteger a las poblaciones más que a una planta en particular, aunque ciertos hospederos se controlan individualmente. La mayoría de las estrategias de control se aplican antes de que

la planta enferme, como métodos preventivos y no curativos (Achicano 2001). Una de las estrategias es el control químico para la protección de cultivos contra enfermedades empleando plaguicidas y agentes antimicrobianos. Estos métodos tienen el inconveniente de que su empleo continuo provoca efectos negativos sobre el ambiente y la calidad de vida del hombre. Además, la eficiencia del control químico puede ser de corta duración debido a que los organismos patógenos en algunos casos desarrollan resistencia a los mismos en pocos años (2-5 años). Estos productos también pueden llegar a acumularse en los alimentos, suelo y agua cuando no se respetan las dosis e intervalos de seguridad. Otra estrategia es el manejo integral de plagas que implica un conjunto de técnicas de control que son favorables desde un punto de vista biológico (inhibitorio, antibiótico), económico y ecológico, permitiendo el uso de elementos naturales para regular la población de patógenos por debajo del nivel de daño que sería económicamente aceptable (Serrano and Galindo 2007). El control biológico de hongos fitopatógenos se puede lograr de una forma total o parcial mediante el uso de organismos antagónicos o enemigos naturales, reduciendo la cantidad de dispersión, causando inhibición del crecimiento o a través de la lisis de las células del patógeno, entre otros mecanismos. Los microorganismos empleados en el biocontrol de fitopatógenos son generalmente aislados del suelo o plantas y es necesario una evaluación exhaustiva de su eficiencia como antagonista bajo diferentes condiciones (laboratorio, casa verde, campo) para determinar características óptimas de crecimiento y acción. El complejo modo de acción de microorganismos como controladores biológicos posee algunas ventajas sobre los productos químicos ya que el patógeno tendrá mayor dificultad para desarrollar resistencia hacia ellos (Serrano and Galindo 2007). Es ideal que un agente de control biológico eficaz cuente con varios mecanismos antagonistas que actúen en conjunto para neutralizar al patógeno, tales como la colonización rápida del hábitat, incluyendo buena competencia por

espacio y nutrientes, el parasitismo sobre el patógeno, producción de enzimas líticas que sean capaz de degradar y atacar al patógeno, producción de antibióticos y la destreza para inducir la resistencia contra el patógeno por medio de la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta (Serrano and Galindo 2007). Aquellas plantas que llegan a resistir al ataque de un patógeno, en un ambiente donde están expuestas al ataque de este, se le puede atribuir la resistencia a la planta en sí, o a microorganismos antagonistas que habitan dentro de ella. Finalmente, otra estrategia es el uso de variedades de cultivos resistentes a enfermedades generadas ya sea por mejoramiento vegetal clásico o asistido por marcadores moleculares.

1.8. Justificación del estudio

El estudio de las enfermedades en las plantas es de gran importancia para el hombre ya que las mismas perjudican a estas y sus productos. Las enfermedades que se presentan en las plantas pueden acabar con cosechas, marcar una gran diferencia entre productos vegetales inocuos o tóxicos, causar migraciones, y otros fenómenos sociales (Agrios 2005). Un ejemplo clásico de efecto socioeconómico causado por una enfermedad de un cultivo es lo que se ha denominado como “La Gran Hambruna” ocasionada por el oomycete *Phytophthora infestan*, ocurrida en Irlanda, donde las cosechas de papas, principal fuente de alimento, fue afectada en ese entonces, en el año 1485 y se propagó por Escocia, Alemania, Noruega, Dinamarca e Inglaterra. Esto ocasionó la muerte de más de un millón de personas y la migración de miles de irlandeses y otros europeos a Norteamérica (Vanhaute 2006). Las enfermedades de plantas también son importantes debido a que provocan que los agricultores sufran pérdidas económicas, favoreciendo el aumento de precios en los productos y destruyendo la belleza del ambiente. Adicionalmente, pueden afectar plantas ornamentales en zonas urbanas como avenidas en ciudades, y especies en parques y bosques, reduciendo la variabilidad de plantas que puedan desarrollarse en una determinada zona geográfica.

Un ejemplo de enfermedad que ha causado grandes consecuencias es la grafiosis de los olmos (*Ulmus* spp.), en regiones templadas y tropicales de Europa, Asia y Norteamérica. Fue detectada por primera vez dentro de Europa, Holanda 1919, y arrasó con la especie *Ulmus × hollandica* por lo que es conocida como enfermedad del olmo holandés (Pajares and Gil 1985). En Norteamérica el *Ulmus americana* (olmo americano) ha estado siendo eliminado como árbol de sombra, debido al efecto patogénico del hongo *Ceratocystis ulmi* (Agrios 2005). Peor ha sido lo que ha sucedido con especies del género *Castanea*, donde se observa el cancro del castaño, causado por el hongo ascomiceto *Cryphonectria parasítica*. Este

patógeno interrumpe el suministro de savia ya que afecta el tejido vascular y esto provoca el marchitamiento de hojas, ramas y formación de brotes de yemas largamente dormidas justo debajo del cancro manifestando necrosis. Las especies más susceptibles a esta enfermedad son: *Castanea dentata* (castaño americano) que ha sido removido de los bosques de Norteamérica y *Castanea sativa* (castaño común o castaño europeo), que está considerado como el problema fitosanitario más grave del castaño a nivel mundial (Gullusci and Turina 2007; Aguin et al. 2005).

En Panamá se reportó por primera vez una enfermedad que ha causado grandes afectaciones a la producción de banano a nivel mundial y que se conoce como el mal de Panamá, enfermedad causada por *Fusarium oxysporum*. Esta nociva enfermedad ataca a las musáceas (Batlle and Pérez 2009) y se desarrolla favorablemente en regiones tropicales (Moore et al. 1995), en la actualidad es una de las diez plagas más importantes en la agricultura a nivel mundial, empezando en Panamá en la década de 1940 y afectando a más de 50 mil hectáreas de cultivo en América (OIRSA 2009). Cultivos como el guandú (*Cajanus cajan*) también se han visto afectados en Panamá por diversas enfermedades, incluyendo la Roya (*Uredo cajani*) que ataca a las hojas, y que se caracteriza por la presencia de pústulas en el envés, así como también la antracnosis de este cultivo, causada por *Colletotrichum cajani* que ataca las vainas y semillas. Otros cultivos en Panamá que se han visto severamente afectados por microorganismos patógenos son el ñame, arroz, naranja, entre otros (Esquivel R. 2011).

Hoy en día, las industrias han incrementado la utilización de las plantas como materia prima como por ejemplo para producción de caucho y medicamentos. El mejoramiento de la vida ha incrementado la necesidad de más y mejores frutos, hortalizas y producción de aceites

para tener una dieta sana y normal, así también está la necesidad de cosechar plantas para nuestros deleites como el tabaco, marihuana, café, té y cacao. Las plantas forman parte esencial de nuestro ambiente porque constituyen un mecanismo regulador al balancear la concentración de CO₂ en la atmósfera, evitando así la erosión e inundación de los suelos y mejora de las propiedades físicas e influyendo en la fertilidad del suelo al proporcionarle materia orgánica (Agrios 2005).

Anacardium excelsum está ampliamente distribuida en el área del Canal de Panamá, así como en la vertiente Pacífico del país. Una enfermedad que afecte a *A. excelsum* a nivel nacional, podría provocar la pérdida de una especie que sirve como barrera natural para la protección de los suelos y ríos de Panamá ya que, *Anacardium excelsum* se encuentra como una de las mejores opciones para reforestación en suelos pocos fértiles y ácidos tropicales en comparación con *Tectona grandis* (Teca), considerada la especie más valiosa para la reforestación tropical (Fujisawa et al., 2012), pero que requiere mucha agua y tiende a secar los suelos.

Las ciencias biológicas han permitido la identificación, y prevención de enfermedades y epidemias en distintos seres vivos. Esto incluye preparar un método de protección antes que los problemas fitosanitarios se intensifiquen.

En el año de 2016 se observaron síntomas de antracnosis foliar en un árbol de *A. excelsum* en el campus central de la Universidad de Panamá, en ciudad de Panamá, con una gran proporción de su follaje afectado y de etiología desconocida (Figura 1). Debido a la intensidad de la afectación y la relevancia de la especie como recurso para reforestación, fuente de alimento y protección del recurso de agua, consideramos importante realizar un estudio con el propósito de identificar el agente causal y reportar los síntomas observados.

Con este proyecto brindamos información para abrir el campo a futuras investigaciones de prevención y control de patógenos de *A. excelsum* en Panamá.

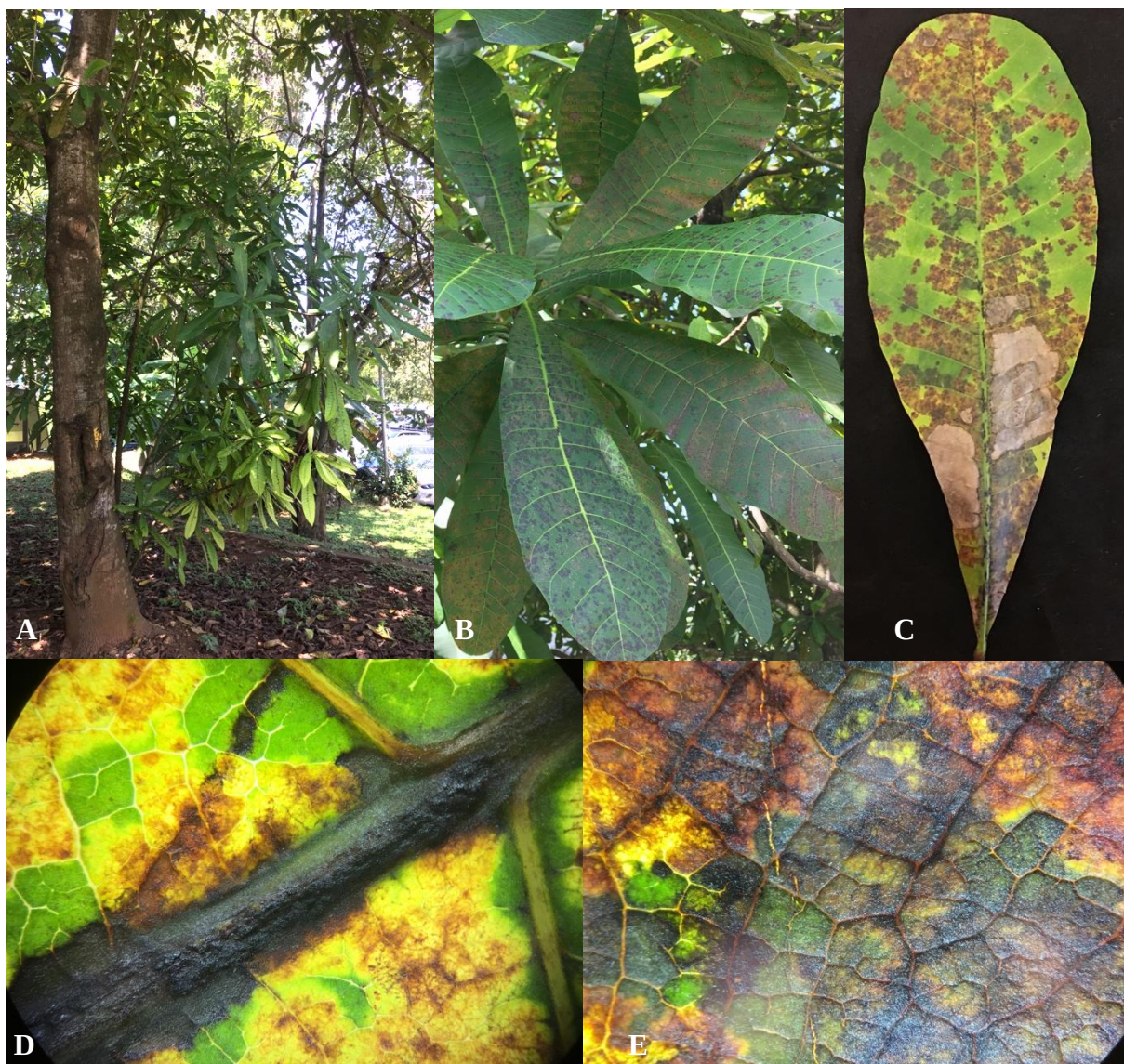


Figura 1. Individuo de *Anacardium excelsum* con síntomas de antracnosis foliar y objeto de este estudio. A - C. Árbol con sintomatología de antracnosis. D, E. Lesiones foliares vistas en el estereoscopio.

1.9. Objetivo General

- Identificación morfológica y molecular de agente causal de síntomas de antracnosis foliar en individuo de *A. excelsum* ubicado en el Campus Dr. Octavio Méndez Pereira de la Universidad de Panamá.

1.10. Objetivos Específicos

- Recolectar hojas de *A. excelsum* con síntomas de antracnosis foliar para aislamiento de agente causal.
- Describir la sintomatología causada por fitopatógeno en las hojas del *A. excelsum*.
- Comprobar patogenicidad de los aislados siguiendo los postulados de Koch.
- Identificar morfológicamente y molecularmente al fitopatógeno asociado con la sintomatología.
- Identificar posibles hongos que causan inhibición del fitopatógeno.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitio de Estudio

En julio de 2016 se observaron síntomas de antracnosis foliar en un árbol de *A. excelsum* ubicado a un costado del edificio de Posgrado de la Escuela de Biología en la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, en el campus Octavio Méndez Pereira de la Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá. Este árbol se encuentra a 47 m de altura sobre el nivel del mar, a 08° 59'09,8" al norte y 079° 31' 58,8" al oeste (GPSMAP 64, GARMIN). Las lesiones se caracterizaban por ser de forma redonda, pequeñas y otras llegaban a alcanzar toda la lámina de la hoja. Tenían un color chocolate oscuro y los bordes de la lesión se veían de un tono amarillento. Las lesiones se localizaban en la nervadura y lámina de las hojas tanto jóvenes como adultas del árbol. El individuo era un árbol maduro de *A. excelsum* de unos seis metros de altura.

2.2. Colecta y Aislamiento del Patógeno

El 4 de agosto de 2017 se recolectaron seis hojas con síntomas de antracnosis foliar de *Anacardium excelsum* y que no presentaban daños mecánicos ni de insectos. Las lesiones fueron clasificadas morfológicamente en diferentes etapas de desarrollo (lesión 1-lesión 5). El proceso se realizó observándolas bajo un estereoscopio ZEISS Stemi 2000-C. De estas se seleccionaron cinco hojas con aproximadamente 70 % del área foliar con síntoma y una hoja colonizada parcialmente (menos de 20% de área foliar con síntomas). Se descartó que la lesión fuese ocasionada por bacteria o virus patogénico y se procedió a aislar hongos de las lesiones como posible agente patogénico. Específicamente se procedió a aislar de lesiones ubicadas en dos partes de las hojas afectadas (lámina, nervadura), las cuales fueron clasificadas con código AE1 y AE2 respectivamente. Específicamente se cortaron con un

bisturí estéril pedacitos de ~ 2 x 2 mm de la lámina o nervadura, dejando una parte del corte libre de lesión y la otra con lesión. Los cortes de hojas fueron colocados en filtros de té para ser desinfectados y limpiados superficialmente. Se hizo inmersión de los pedacitos de hoja en Etanol al 70% por 2 minutos, lo cual fue seguido de inmersión en Hipoclorito de Sodio al 0.35% por 3 minutos.

Una vez desinfectados de manera superficial, seis pedacitos se colocaron sobre medio Agar Papa Dextrosa (PDA) en platos Petri de 60 x15mm y se dejaron crecer a 25°C. Los platos fueron revisados al cuarto día, los hongos que habían crecido alrededor de los cortes de hoja con lesión se transfirieron a nuevos platos Petri de 60x15 mm con PDA, con cuatro réplicas para cada morfoespecie aislada. La asignación de morfoespecie se basó en características generales de los cultivos de hongos aislados, como: color, forma, altura de micelio, tasa de crecimiento, cambio de coloración del medio, producción y tipo de esporas.

2.3. Pruebas de patogenicidad *in vitro*, en laboratorio.

Se recolectaron hojas sanas de *A. excelsum* para ser utilizadas en inoculaciones controladas de hongos aislados en cámara húmeda a 25°C. Primero se hizo una caracterización de diferentes etapas de desarrollo de hojas de *A. excelsum* considerando color, tamaño y textura, para determinar el más óptimo para las pruebas de inoculación. Fueron definidas cuatro etapas de desarrollo (Figura 4) a las cuales se le identificó con letras A-D. Siendo:

- A. Hojas con longitud de 10cm a ~18cm, coloración rojiza en la mitad superior y textura blanda.
- B. Hojas que pueden llegar a medir hasta ~30cm, en su mayoría verde medio y textura blanda, pero más firmes que en el estadio A.

- C. Hojas verdes en su totalidad, llegando a medir hasta ~35cm, textura coriácea, más aún no llega al estadio adulto.
- D. Hojas color verde oscuro con longitud de hasta ~35cm y textura coriácea, completamente lignificada, considerado como el estado de maduración o desarrollo completo debido a la rigidez que presenta en comparación con el estadio C.

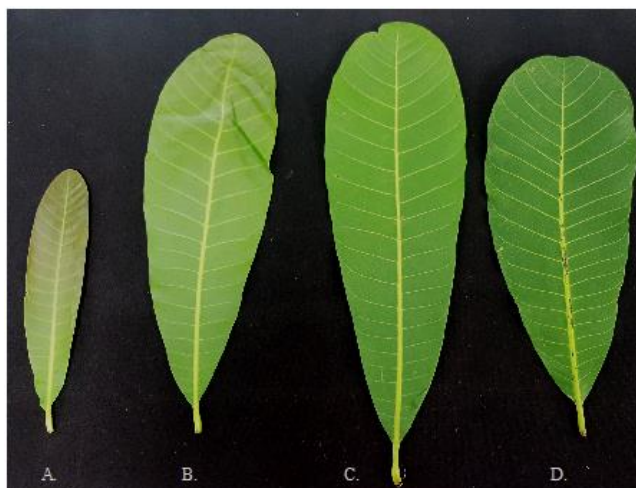


Figura 2. Clasificación de hojas de *A. excelsum* en base a fases de desarrollo. Las características estructurales generales de la hoja son controladas por la herencia y son relativamente constantes para cada especie, pero el tamaño y forma son plásticos y pueden ser modificados, hasta cierto punto, por el ambiente.

Se realizó una prueba preliminar en hojas con las distintas fases de desarrollo para seleccionar el tipo de hojas que se iban a utilizar en las pruebas. Se utilizaron las hojas de fase de desarrollo C ya que en la prueba preliminar se caracterizaron por presentar una textura lo suficientemente resistente a la humedad, lo que evitó que se pudrieran fácilmente, y a la vez no presentaban tanta dureza facilitando la observación de la colonización.

Las cámaras húmedas consistían en cajas de polipropileno de dimensión (16,51 cm de largo x 60 cm de ancho x 41,6 cm de profundidad aproximadamente) con papel toalla humedecido con agua destilada en la base. En estas, se colocaron hojas enteras de *A. excelsum* en etapa de desarrollo “C” con la superficie adaxial (haz) hacia abajo y se inocularon en la cara abaxial

(envés). Las inoculaciones fueron realizadas con cilindros de agar de 6mm obtenidos del micelio de las morfoespecies de hongos que se aislaron de las lesiones. Se les agregó 50µL de agua estéril a los cilindros de agar para aumentar la humedad directamente en la zona de inoculación. Por cada morfoespecie de hongo a inocular, se utilizaron dos hojas con cuatro cilindros de agar por cada una. También se colocaron hojas sin cilindros de agar como grupo de control, a las cuales sólo se les agregó gotas de agua estéril. Las hojas fueron revisadas en un período de siete días para identificar que morfoespecies causaban lesiones similares a las observadas en campo. Una vez determinada la morfoespecie que causó las lesiones, se evaluó qué tipo de cambios de apariencia en la hoja fueron originados y su similitud a las lesiones presentes en el árbol de estudio. Finalmente, se reaisló el hongo a partir de las lesiones obtenidas *in vitro* en medio PDA y se esperó siete días para el crecimiento del hongo para su comparación.

2.4. Prueba de patogenicidad *in vivo*, campo

De las pruebas de patogenicidad *in vitro* se seleccionó un aislamiento capaz de causar lesiones similares a las observadas en campo para utilizarlo en pruebas *in vivo*, es decir, de inoculación de hojas de árboles de *A. excelsum* que no presentaban los síntomas de la enfermedad. El hongo causal de las lesiones en las pruebas *in vitro*, se sembró en un plato Petri de 65mm con PDA y se dejó crecer durante diez días para realizar una suspensión de esporas de la siguiente forma:

1. Se le agregó 10mL de agua estéril al cultivo del hongo después de 10 días de crecimiento.
2. Con un asa estéril se raspó la superficie del cultivo para extraer las esporas junto con el micelio en el agua.

3. Se filtraron las esporas con la ayuda de un pedazo de media de nylon previamente esterilizada, colocándolo en un envase también estéril.
4. Se determinó una concentración de $13,8 \times 10^6$ esporas por mL, empleando un hematocitómetro o cámara de Neubauer, a la cual se le agregó 10 μ L de la suspensión de esporas y se colocó en el microscopio para determinar si había la cantidad necesaria de esporas.
5. Por último, se transfirió la suspensión de esporas a una botella con atomizador para la inoculación de las hojas en campo.

En campo se seleccionaron dos árboles de *A. excelsum* maduros y sanos. De cada árbol se escogieron tres ramas con múltiples hojas totalmente sanas y de diferentes etapas de desarrollo para la inoculación con la suspensión de esporas. Una de las ramas seleccionadas se mantuvo como grupo de control a la cual sólo se le asperjó agua, a las otras dos se le asperjó la solución de esporas por ambos lados de la hoja. Las ramas con las hojas inoculadas fueron cubiertas con bolsas plásticas traslucidas con el fin de mantener la humedad, proporcionar protección contra lluvias, o agentes mecánicos que afectasen las hojas. Las bolsas fueron amarradas con cinta adhesiva y se rotularon. Las hojas fueron revisadas en un período de siete días para permitir que las esporas colonizaran la hoja. Una vez que las hojas presentaron lesiones, se recolectaron dos hojas de cada árbol para reislamiento y confirmar que el hongo inoculado fue el que produjo las lesiones, empleando el mismo método de aislamiento a partir de las lesiones naturales explicado anteriormente. Se compararon las lesiones originadas en el ensayo con las lesiones del árbol en estudio y luego se comparó el reislado con el hongo inoculado.

2.5. Caracterización morfológica del patógeno

La caracterización del hongo fitopatógeno se realizó basándose principalmente en las siguientes diferencias morfológicas: 1) Características del cultivo como color, temperatura óptima y tasa de crecimiento, lo cual fue realizado haciendo crecer al hongo en medio PDA, revisándose al quinto, décimo y decimoquinto día de puesto a crecer. En cada uno de estos días se tomaron fotografías junto con una regla para servir como escala y las imágenes fueron analizadas con el programa computacional ImageJ (Rasband, W. S. 1997). 2) Características microscópicas mediante la observación y medición de la forma y tamaño de las conidias, presencia o ausencia de setas, y estructuras miceliales, empleando la técnica de cultivo en portaobjetos para la visualización de estas. La cual se realizó colocando papel toalla estéril dentro de platos Petri vacíos. En el, se insertaron tres portaobjetos con dos como base y uno diagonal creando una forma de cruz, en los cuales se les colocó un cuadro de 1 X 1 cm de PDA en los extremos de cada portaobjeto. Con un asa micológica a cada cuadro de agar se le inoculó una pequeña porción del hongo, colocándosele un cubreobjetos y humedeciéndose el papel toalla con ~ 1,5mL de agua estéril y cubriendo los platos con parafilm. Posteriormente, se dejaron incubando en un lugar oscuro a temperatura ~ 25°C. Utilizando el microscopio OLYMPUS BX53 con cámara digital DP73 (Olympus, Japan), se revisaron los cubreobjetos, añadiendo ~ 50µL de agua al portaobjeto para facilitar la visualización. Las mediciones de las conidias se realizaron con el software CellSense Dimension (Olympus, Japan).

2.6. Identificación molecular de hongos, Extracción de ADN

Como parte de esta tesis se hizo identificación molecular de las diferentes morfoespecies de hongos aislados y del patógeno. Para realizar las extracciones de ADN se usaron cultivos puros de los hongos, de siete días de crecimiento en PDA a $\sim 25^{\circ}\text{C}$. Las extracciones de ADN se realizaron usando el protocolo de purificación de ADN para tejido, empleando el kit de tejido de Gentra Puregene, página 39, Gentra Puregene Handbook; tercera edición, abril 2010. La cantidad de reactivos fue según la tabla 5 del mismo manual (para 10 – 20 mg de micelio).

Primero se cosechó aproximadamente 2cm^2 de micelio del margen de cultivo o área de crecimiento activo con un bisturí estéril. Luego fue colocado en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL que contenía arena y una bola de cerámica estéril para homogenizar. Inmediatamente se le agregó 600 μL de solución de lisis y homogenizó a 2000 rpm durante 1 min, posteriormente se colocaron en baño maría a 65°C por 60 min., se invirtió 3 veces el contenido cada 20 min, se dejó enfriar y se agregó 1,5 μL de solución RNAsa y se volvió a invertir 25 veces. Posterior a esto se siguieron todos los pasos del protocolo del kit de tejido de Gentra Puregene hasta obtener ADN.

Una vez obtenido el ADN total del tejido extraído, se determinó la integridad del ADN de las muestras por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, suplementado con 2,5 μL de SYBR® Safe. Para conocer las concentraciones de ácido nucleico y su calidad por absorbancia se usó el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Wilmington, DE 19810 U.S.A.).

2.7. Amplificación de loci por PCR y secuenciación

Se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para obtener múltiples copias de fragmentos de ADN de las regiones de interés de los loci secuenciados, específicamente el locus ITS completo incluyendo ITS1, 5.8S, e ITS2, código de barras molecular más empleado para hongos (Schoch et al. 2012; Seifert 2009). Una región del gen que codifica para β -tubulina y otra región del gen que codifica para factor de elongación 1 alpha (TEF1 α). Para la amplificación de ADN se usaron los siguientes cebadores y cuya secuencia aparece en el cuadro 1, para la región ribosomal ITS cebadores ITS4 e ITS5 (WhiteT. et al. 1990), para β -tubulina T1y T2 (O'Donnell and Cigelnik 1997); y para TEF1 α , cebadores EF728 -1199 (Carbone & Kohn 1999, Mejía et al. 2011) y EF983-1567 (Rehner 2001). Para esto se necesitó: ADN molde de los hongos; ADN polimerasa (Taq Polimerasa), cebadores y nucleótidos libres. Cada reacción de PCR de 25 μ L, incluyó los componentes del cuadro 2.

Cuadro 1. Cebadores usados en el estudio.

Locus	Nombre	Cebadores	Dirección	Secuencia de cebadores	Referencia
ITS	Espaciador transcrito interno	ITS-5	Foward →	5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3'	White <i>et al.</i> 1990
		ITS-4	Reverse ←	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White <i>et al.</i> 1990
TUB2	β -tubulina	T1	Foward →	5'-AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3'	O'Donnell & Cigelnik 1997
		T2	Reverse ←	5'-TAG TGA CCC TTG GCC CAG TTG-3'	O'Donnell & Cigelnik 1997
TEF1 α	Factor de elongación 1 α	EF1-728F	Foward →	5'- CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3'	Carbone & Kohn 1999
		EF1-1199R	Reverse ←	5'- GGG AAG TAC CMG TGA TCA TGT-3'	Mejía et al. 2011
		EF1-983F	Foward →	5'- GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT-3'	Rehner 2001
		TEF1-1567R	Reverse ←	5'- ACH GTR CCR ATA CCA CCR ATC TT-3'	

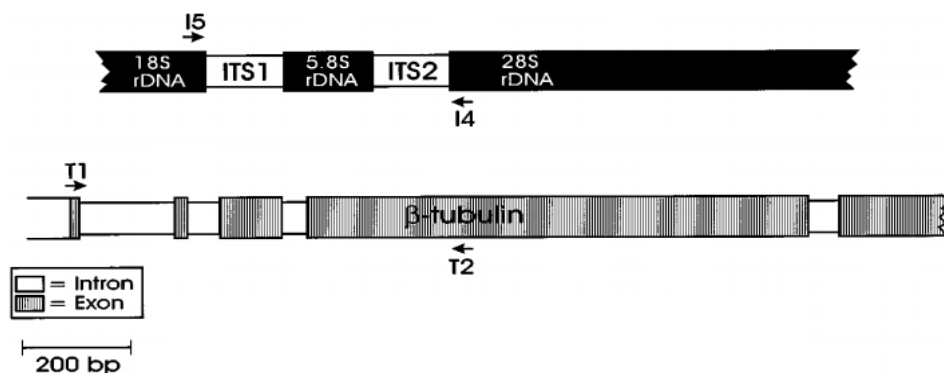


Figura 3. Mapa de loci ITS y β -tubulina con posición relativa de cebadores usados para amplificación de β -tubulina. Tomado de O'Donell and Cigelnik 1997.

Cuadro 2. Reactivos usados en las PCRs.

Componentes	ITS	β -tubulina	TEF1 α
Buffer de enzima 10x	2.25 μ L	2.25 μ L	2.25 μ L
dNTP's	2.25 μ L	1.0 μ L	1.0 μ L
Primer 1 (Forward)	1.25 μ L	1.25 μ L	1.25 μ L
Primer 2 (Reverse)	1.25 μ L	1.25 μ L	1.25 μ L
MgCl ₂	2.25 μ L	0.7 μ L	0.7 μ L
Taq ADN polimerasa (Qiagen, Alemania)	0.3 μ L	0.4 μ L	0.4 μ L
H ₂ O molecular	9.45 μ L	14.9 μ L	14.9 μ L
ADN (20-30ng/ul)	1.0 μ L	1.0 μ L	1.0 μ L
Qsolution	5.0 μ L	2.25 μ L	2.25 μ L

En todas las evaluaciones se usó un control negativo (muestra que contenía todos los componentes de la reacción excepto el ADN) para comprobar que los componentes de la reacción estuvieran libres de ADN contaminante o que no hubiera contaminación cruzada de las muestras.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems®, modelo 2720. Las condiciones de la PCR para ITS (Figura 8) fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, una extensión final por 10 minutos a 72°C, y finalizó a 4°C por 5 minutos para conservar las muestras. Obteniéndose múltiples copias de fragmentos de ADN molde de la región de interés. Las condiciones para β -tubulina sólo vario en la temperatura de hibridación, siendo 58°C.

Para el locus TEF1 α : desnaturalización inicial a 95°C por 8 minutos, seguido de 32 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 59 segundos, una extensión final por 5 minutos a 72°C, y finalizó a 4°C por 5 minutos.

Posterior a las amplificaciones se tomaron 3 μ L de los productos de reacción que fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% para visualizar si hubo o no amplificación de la región de interés. El tamaño de los productos de reacción se comparó con el marcador de peso molecular 1KB Plus DNA Ladder (Invitrogen). La visualización de las bandas amplificadas se realizó a través de un transiluminador UV (Ultra Lum, EEUU) y documentado digitalmente con el programa UltraQuant (Ultra Lum, EEUU).

Los productos de PCR fueron purificados para la secuenciación usando el reactivo de limpieza ExoSAP-IT® (Affymetrix, EEUU), siendo su principal función remover excesos de cebadores y nucleótidos no incorporados en la PCR. Este reactivo consta de dos enzimas hidrolíticas en un buffer especialmente formulado, éstas enzimas son: exonucleasa I y SAP (fosfatasa alcalina de camarón).

Para la reacción se usó 2 μ L de EXOSAP-IT y 5 μ L de productos de PCR en una dilución 1:10. Las muestras fueron homogenizadas en un vortex y luego incubadas en el

termociclador, a 37°C se hidrolizaron los cebadores en exceso y desfosforilaron los nucleótidos, a 80°C se inactivó completa e irreversiblemente la enzima del reactivo EXOSAP-IT. Finalmente, se dejó reposar por 5 minutos a 4°C para conservación de las muestras en hielo.

Para la secuenciación Sanger, los productos purificados fueron secuenciados con reactivos del kit BigDye® Termination Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, EEUU) en un secuenciador AB 3500xL (Hitachi, EEUU).

Luego de generadas las secuencias, se utilizó el software bioinformático Sequencher® (Gene Codes Corporation) para el ensamblaje y análisis de las secuencias de ADN obtenidas y se determinó su identidad en la base de datos del GenBank® mediante el programa BLASTn (Altschul et al. 1997).

2.8. Filogenia del patógeno

Para conocer las relaciones filogenéticas del patógeno causante de antracnosis de *A. excelsum*, utilizamos secuencias de las regiones ITS y β -tubulina comparadas con secuencias de especímenes tipo (cuadro 3), estas secuencias se obtuvieron del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Se utilizó el programa MEGA (Análisis Genético Molecular Evolutivo) para alinear y concatenar los dos loci (Nei and Kumar 2000). Se alineó utilizando el método de alineamiento Muscle implementado en MEGA. Se realizó un análisis de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) del alineamiento de los dos loci utilizando modelo GTR con 1000 réplicas bootstrap (Kumar et. al, 2018; Stecher et. al, 2020). La secuencia de la región TEF1 α del fitopatógeno aislado fue utilizada para comprar este con especímenes disponibles en GenBank, pero no utilizada en el análisis filogenético

ya que la mayoría de especímenes tipo no presentaban secuencias TEF1 α en esta base de datos.

Cuadro 3. Secuencias de ADN de especímenes tipo del género *Colletotrichum* obtenidas de la base de datos GenBank® y utilizadas en análisis filogenético.

Especie	Cepa	Hospedero	País	Número de acceso GenBank®	
				ITS	TUB2
<i>Colletotrichum aenigma</i>	ICMP 18608	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244	JX010389
<i>Colletotrichum aeschynomenes</i>	ICMP 17673	<i>Aeschynomene virginica</i>	USA	JX010176	JX010392
<i>Colletotrichum alatae</i>	CBS 304.67	<i>Dioscorea alata</i>	India	JX010190	JX010383
<i>Colletotrichum alienum</i>	ICMP 12071	<i>Malus domestica</i>	Nueva Zelanda	JX010251	JX010411
<i>Colletotrichum aotearoa</i>	ICMP 18537	<i>Coprosma</i> sp.	Nueva Zelanda	JX010205	JX010420
<i>Colletotrichum asianum</i>	ICMP 18580	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	FJ972612	JX010406
<i>Colletotrichum clidemiae</i>	ICMP 18658	<i>Clidemia hirta</i>	USA, Hawaii	JX010265	JX010438
<i>Colletotrichum cordylinicola</i>	MFLUCC 090551	<i>Cordyline fruticosa</i>	Tailandia	JX010226	JX010440
<i>Colletotrichum fruticola</i>	ICMP 18581	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	JX010165	JX010405
<i>Colletotrichum fruticola</i> (syn. <i>C. ignotum</i>)	CBS 125397	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panamá	JX010173	JX010409
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	ICMP 17821	<i>Citrus sinensis</i>	Italia	JX010152	JX010445
<i>Colletotrichum horii</i>	NBRC 7478	<i>Diospyros</i>	Japón	GQ329690	JX010450

		<i>kaki</i>			
<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	ICMP 18539	<i>Olea europaea</i>	Australia	JX010230	JX010434
<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>migrans</i>)	CBS 237.49	<i>Hypericum perforatum</i>	Alemania	JX010238	JX010432
<i>Colletotrichum musae</i>	CBS 116870	<i>Musa</i> sp.	USA	JX010146	HQ596280
<i>Colletotrichum nupharicola</i>	CBS 470.96	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX010187	JX010398
<i>Colletotrichum psidii</i>	CBS 145.29	<i>Psidium</i> sp.	Italia	JX010219	JX010443
<i>Colletotrichum queenslandicum</i>	ICMP 1778	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX010276	JX010414
<i>Colletotrichum salsolae</i>	ICMP 19051	<i>Salsola tragus</i>	Hungría	JX010242	JX010403
<i>Colletotrichum siamense</i>	ICMP 18578	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	JX010171	JX010404
<i>Colletotrichum siamense</i> (syn. <i>C. hymenocallidis</i>)	CBS 125378	<i>Hymenocallis americana</i>	China	JX010278	JX010410
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	CBS 124945	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010294	JX010447
<i>Colletotrichum theobromicola</i> (syn. <i>C. gloeosporioides</i> f. <i>stylosanthi</i>)	MUCL 42294	<i>Stylosanthes viscosa</i>	Australia	JX010289	JX010380
<i>Colletotrichum ti</i>	ICMP 4832	<i>Cordyline</i> sp.	Nueva Zelanda	JX010269	JX010442
<i>Colletotrichum tropicale</i>	CBS 124949	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010264	JX010407
<i>Colletotrichum tropicale</i>	MAFF 239933	<i>Litchi chinensis</i>	Japón	JX010275	JX010396

<i>Colletotrichum xanthorrhoeae</i>	BRIP 45094	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Australia	JX010261	JX010448
<i>Colletotrichum tropicale</i>	CBS 124943	<i>Annona muricata</i>	Panamá	JX010277	KP703431.1
<i>Colletotrichum hippeastri</i>	ICMP 17920	<i>Hippeastrum</i> sp.	Holanda	JX010293	JQ005666
<i>Colletotrichum boninense</i>	CBS123755	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japón	JQ005153	JQ005588.1
<i>Colletotrichum boninense</i>	MAFF 305972	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>Sinicum</i>	Japón	JX010292	JQ005588

2.9. Pruebas de antagonismo en cultivos duales de hongos

Se seleccionaron 27 aislados de hongos endófitos de *Coffea arabica* para evaluar la capacidad antagonica de estos aislados contra el fitopatógeno. Estos hongos pertenecen a una colección de hongos de *C. arabica* realizada con el objetivo de entender el rol del microbioma de plantas en las defensas de cultivos vegetales (Mejía, 2015). En platos Petri de 90 mm con PDA se hicieron crecer ambos hongos (fitopatógeno y posible antagonista) a una distancia de 2 cm. Los cultivos duales se realizaron en triplicado, así como también se pusieron a crecer en triplicado cultivos puros individuales de los aislados usados en interacciones duales a manera de control. Adicionalmente, se evaluó el crecimiento del fitopatógeno en medio suplementado con antifúngico nistatina. A los cinco días de puestos a crecer los hongos, se tomaron fotografía de los cultivos y se hizo medición de área de crecimiento micelial en cada una de las condiciones utilizando el programa Image J (Schneider et al. 2012).

Con estas mediciones se calculó el porcentaje de reducción en el crecimiento del área del patógeno en presencia del endófito. Esto se realizó utilizando la siguiente formula:

$\% \text{ de reducción de crecimiento de patógeno} = \frac{CAE - CPE}{CAE} \times 100$, donde CAE es el crecimiento del área del patógeno en ausencia del endófito y CPE es el crecimiento del área del patógeno en presencia del endófito.

La interacción del patógeno con el endófito se clasificó según el tipo de crecimiento e inhibición observado. Se consideró una antibiosis cuando entre el endófito y patógeno aparecía una inhibición del patógeno y competencia por sustrato cuando ambos hongos crecían, pero limitando el crecimiento entre ambos.

Se evaluaron las siguientes cepas de endófitos:

C. gloeosporioides CA1569, CA1600; *C. karstii* CA976, CA982, CA1115, CA1266, CA1271, CA1274, CA1443; *C. pyriformis* CA710; *C. siamense* CA1272; *C. vietnamense* CA1843; *Diaporthe caatingaensis* CA1290; *Mycosphaerella* sp. CA682, CA1730; *Nemania* sp. CA1548; *Pleosporales* CA1319; *Phoma* sp. CA1597; *Phomopsis* sp. CA1438; *Xylaria adscendens* CA554; *Xylaria apiculata* CA1815; *Xylaria enteroleuca* CA1310; *Xylaria* sp. CA1520; Cepas no identificadas (CA1169); (CA1282); (CA1332); (CA1929).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento del patógeno

Seis especímenes de hojas de *A. excelsum* con síntomas de antracnosis fueron colectadas y utilizadas para categorizar las lesiones en cinco tipos en base a su desarrollo y lugar de ocurrencia en la hoja (lámina vs. nervadura) (figura 4). La lesión tipo 1 representa una etapa inicial del desarrollo de lesión en la lámina de la hoja. Lesión 2 representa una lesión en nervadura secundaria de la hoja. Lesión 3, representa la unión de dos lesiones en la lámina. Lesión 4 es la coalescencia de varias lesiones en estado avanzado en la lámina y lesión 5 es la que se desarrolla en la nervadura primaria.

La antracnosis observada en las hojas del *A. excelsum* se caracteriza por presentar lesiones marrones con margen bien definido, las cuales pueden agruparse y verse como una lesión mayor e irregular, aunque algunas lesiones mantienen un borde bien definido. En lesiones más desarrolladas se observó tejido muerto hundido (figura 4, C), necrosado y expandido a lo largo de la hoja, y que termina en un marchitamiento que se aprecia junto con anillos cloróticos alrededor de la lesión (figura 5, E-F). Otras veces la necrosis se manifiesta secando las zonas atacadas como quemaduras, haciendo que la planta tenga aspecto de quemada por el sol (Fig. 5F).

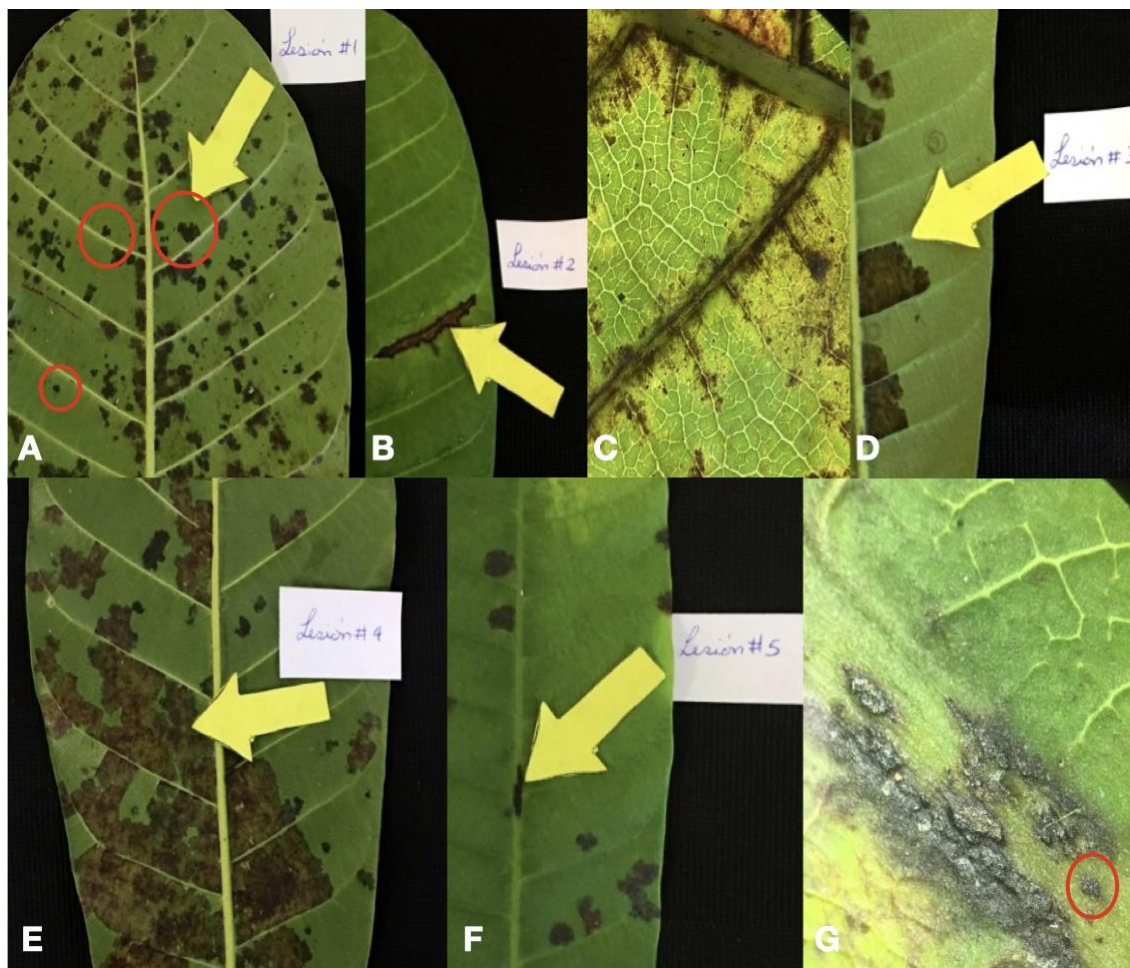


Figura 4. Diferentes tipos de lesiones foliares en base a su estado de desarrollo y ocurrencia en *A. excelsum*. A) Lesión 1, representa una etapa inicial del desarrollo de lesión en lámina de la hoja; B-C) Lesión 2. B) lesión en estado avanzado sobre la nervadura secundaria; C) inicio de lesiones en la nervadura secundaria; D) Lesión 3, representa la unión de dos o más lesiones en la lámina; E) Lesión 4, coalescencia de varias lesiones en estado avanzado en la lámina; F-G) Lesión 5. F) colonización en la nervadura primaria; G) inicio de lesiones en forma radial y luego uniéndose y expandiéndose.

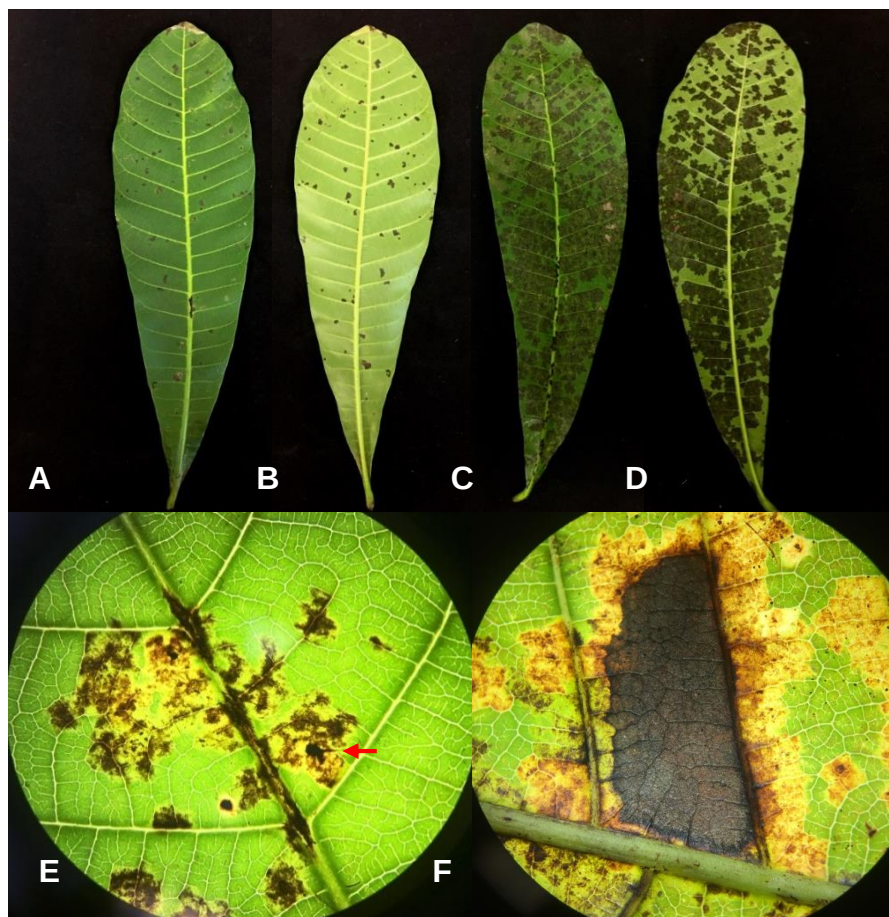


Figura 5. Estado de desarrollo de las lesiones en hojas de *Anacardium excelsum*. A) Lesiones tipo 1 observadas en cara adaxial de la hoja, B) Lesiones tipo 1 observadas en cara abaxial de hoja; C) Cara adaxial de hoja colonizada por lesiones tipo 3 y 4, D) Cara abaxial de hoja colonizada por lesiones tipo 3 y 4; E) Parte adaxial bajo estereoscopio a contra luz mostrando el inicio de desarrollo de lesiones tipo 1 en lámina y tipo 5 en nervadura primaria, en la cual se aprecia cómo se expande la lesión por medio del tejido vascular; F) cara abaxial con lesión en etapa necrótica en lámina.

Se obtuvieron diferentes aislados de hongos a partir de los especímenes colectados, los cuales fueron clasificados en nueve morfoespecies, cinco de las cuales fueron aisladas a partir de la lámina de la hoja y codificados como AE1 (cepas AE1.1, AE1.2, AE1.3, AE1.4, y AE1.5, cada una de las cepas representando una morfoespecie diferente) y cuatro morfoespecies a partir de nervadura y codificados como AE2 (cepas AE2.1, AE2.2, AE2.3, y AE2.4, cada una de ellas representando una morfoespecie diferente) (figura 6).

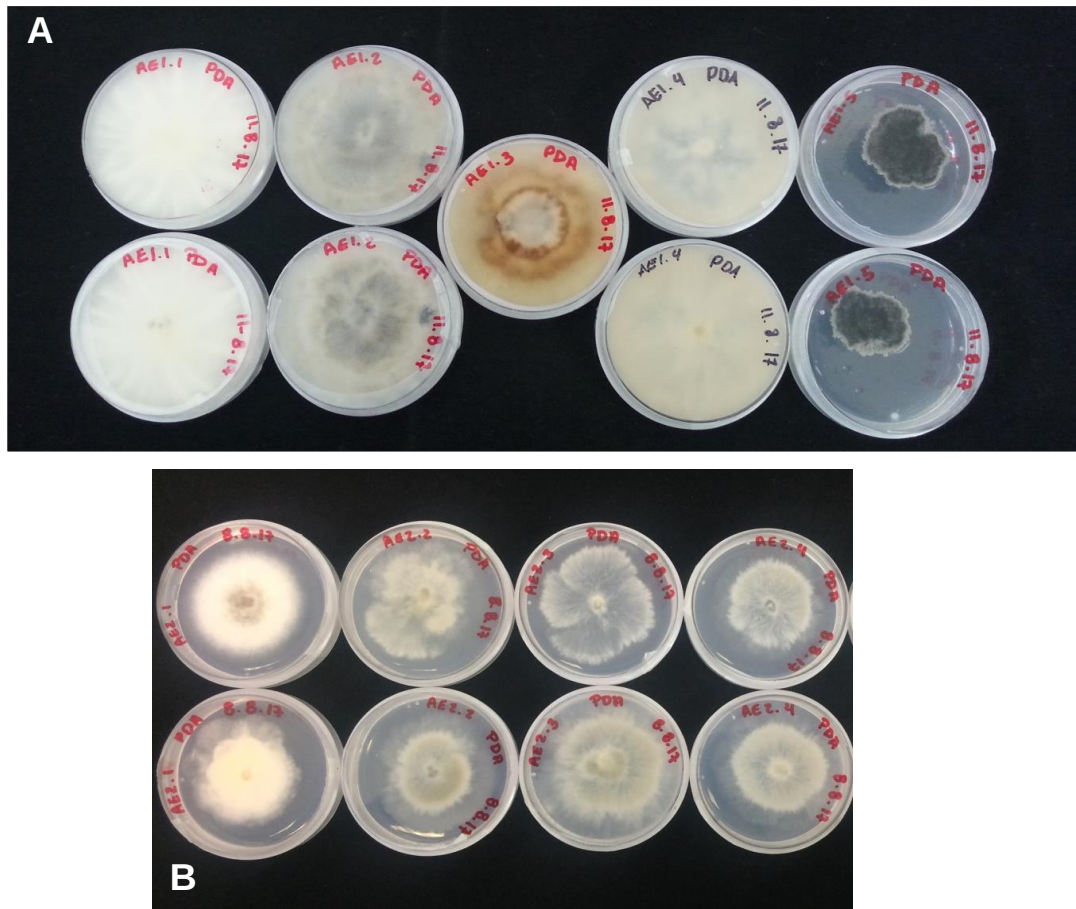


Figura 6. Morfoespecies de hogos aislados de lesiones de *A. excelsum*. A) Morfoespecies AE1, aisladas de lámina foliar. B) Morfoespecies AE2, aisladas de nervadura de la hoja.

3.2. Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Se realizaron tres experimentos de inoculación *in vitro* con cada una de las morfoespecies aisladas y sólo desarrollaron lesiones las hojas inoculadas con la cepa de la morfoespecie AE2.2 (Figuras 7 y 8). Los controles no presentaron lesión (Figura 9).

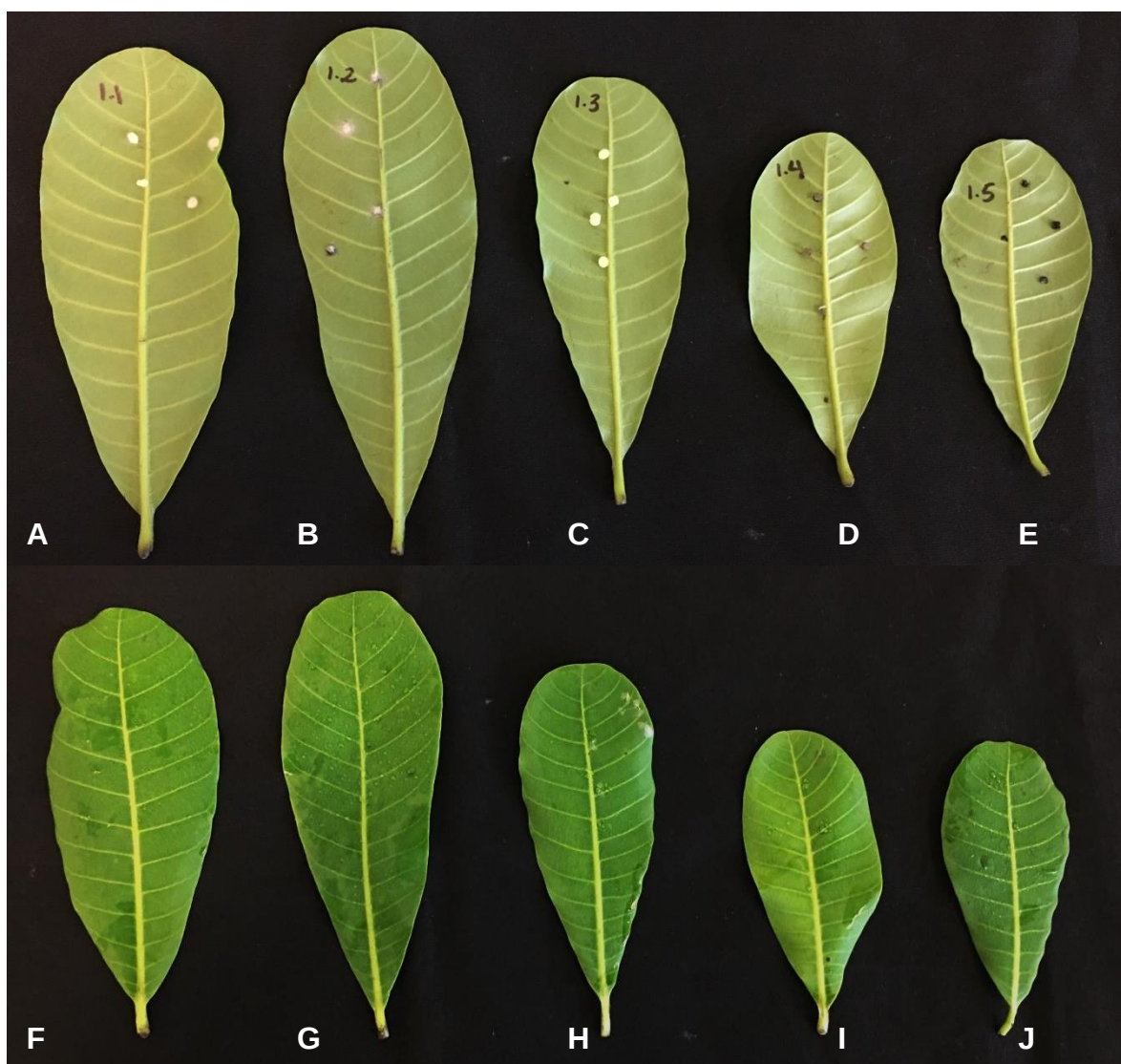


Figura 7. Inoculaciones de hojas de *A. excelsum* con morfoespecies de hongos del código AE1. Las hojas utilizadas para estos experimentos presentan fase de desarrollo C y las fotografías fueron tomadas 7 días después de haber sido inoculadas. A – E) Lado abaxial de la hoja. F – J) Lado adaxial de la hoja. A, F) inoculadas con morfoespecie AE1.1; B, G) Inoculadas con morfoespecie AE1.2; C, H) inoculadas con morfoespecie AE1.3; D, I) inoculadas con morfoespecie AE1.4; E, J) Inoculadas con morfoespecie AE1.5

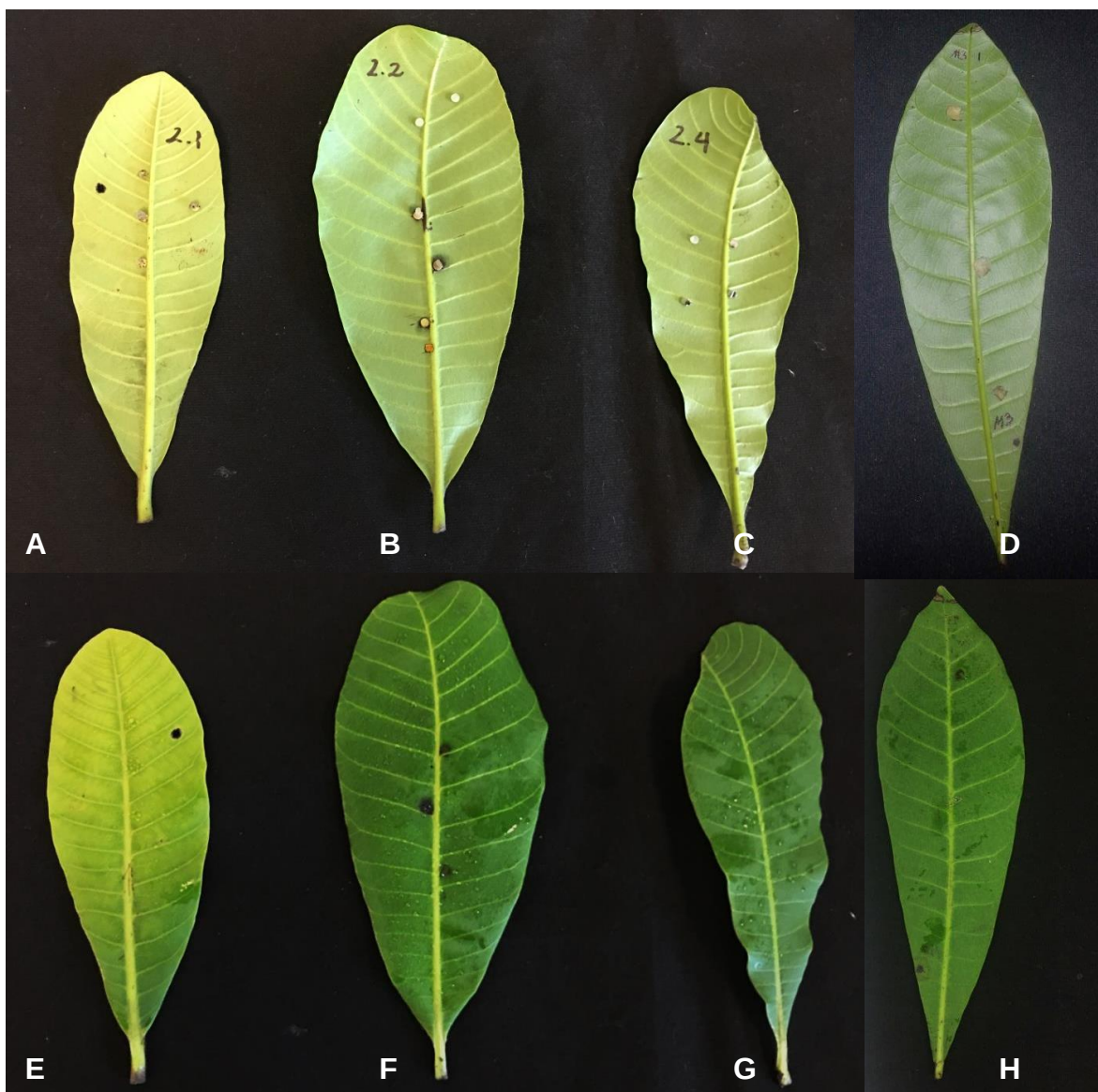


Figura 8. Inoculaciones de hojas de *A. excelsum* con morfoespecies de hongos del código AE2. Hojas en fase de desarrollo C al séptimo día de haber sido inoculadas. A, E) hoja inoculada con morfoespecie AE2.1; B, F) hoja inoculada con morfoespecie AE2.2; C, G) hoja inoculada con morfoespecie AE2.4; D, H) hoja inoculada con morfoespecie AE2.3.



Figura 9. Hojas controles para los experimentos de inoculación *in vitro* en cámara húmeda.

El desarrollo de las lesiones ocasionadas por la morfoespecie AE2.2 en cámara húmeda se muestra en la Figura 10. Las mediciones se realizaron a partir del séptimo hasta el décimo día (Figura 11).

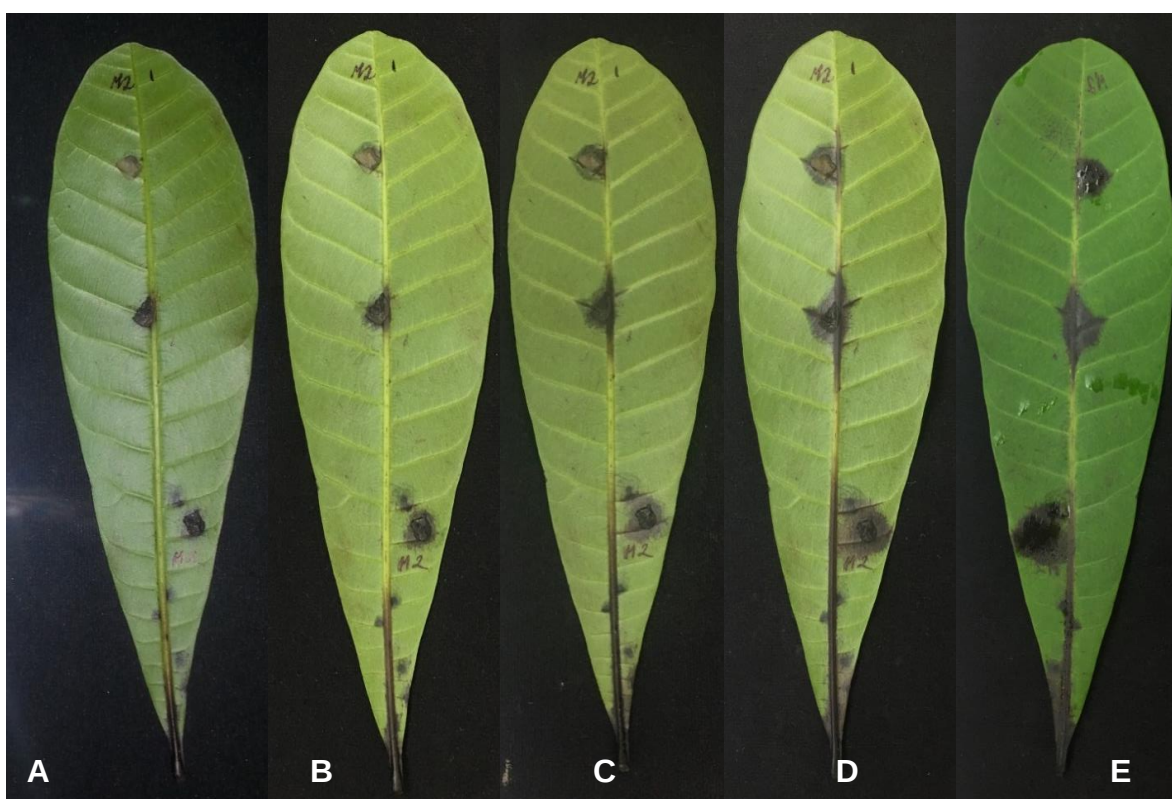


Figura 10. Lesiones ocasionadas por morfoespecie AE2.2. A) Observación al séptimo día. B) octavo día. C) noveno día. D- E) décimo día.

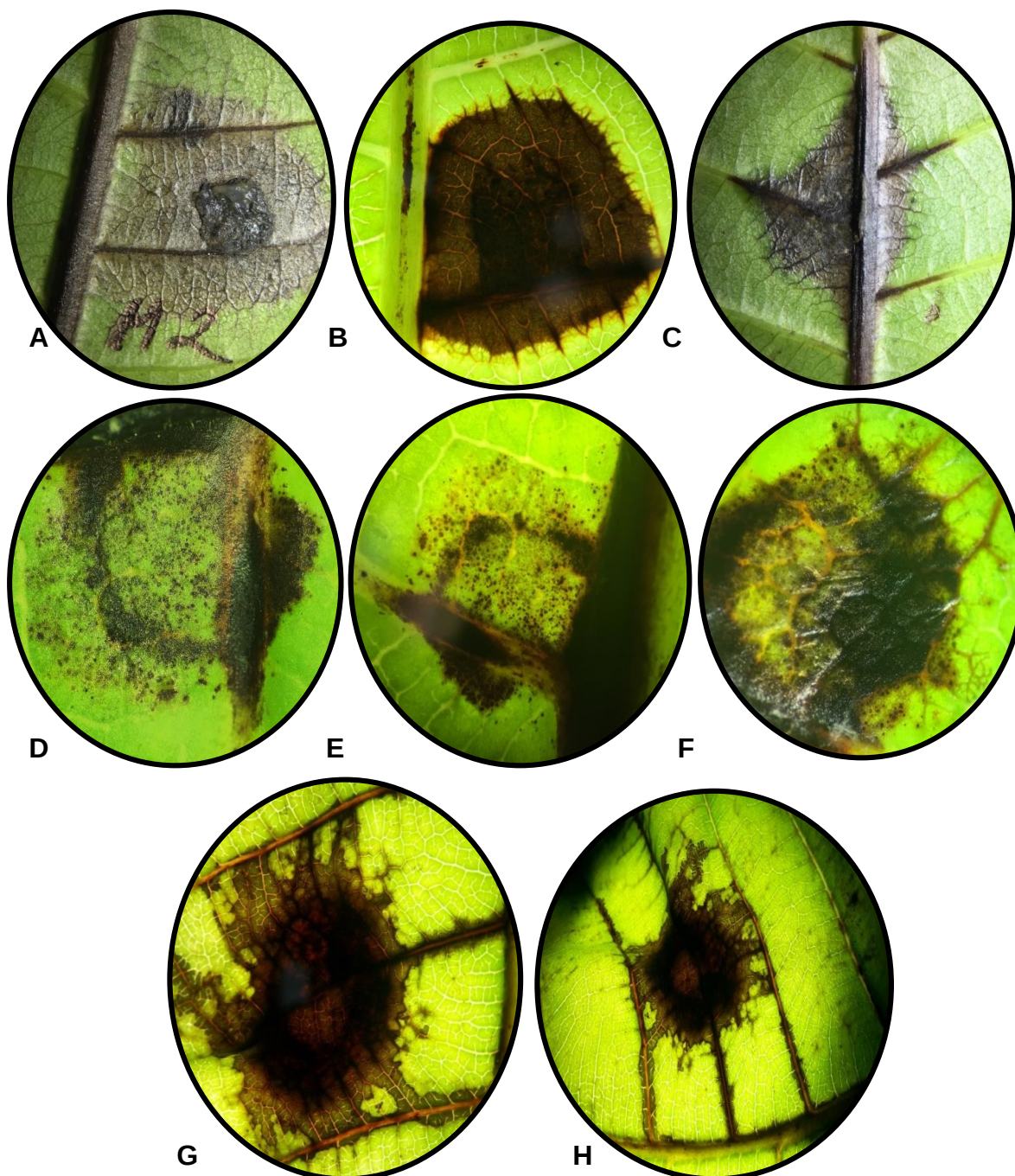


Figura 11. Lesiones vistas bajo estereoscopio. A) Lesión sobre luz; B) Lesión a contra luz; C) Lesión en la distribución de la nervadura primaria y secundaria; D) Múltiples lesiones en forma radial y juntándose en ciertas partes del tejido vascular, cara adaxial, E) cara abaxial; F) colonización del patógeno expandiéndose por el tejido vascular; G) cara adaxial; H) cara abaxial.

Las lesiones generadas por la morfoespecie AE2.2 en las pruebas *in vitro* fueron similares a las observadas en el árbol de estudio, en algunas ocasiones variando solo el inicio de la colonización por el hongo, viéndose varias acumulaciones de las primeras lesiones descritas, ya que, al inocular el hongo sobre una zona específica con el cilindro de agar con micelio, este contenía un alto grado de concentración de esporas.

En base a la similitud de las lesiones causadas por el morfoespecie AE2.2 se consideró a este como el causal de las lesiones en campo. En cada uno de los ensayos *in vitro* de esta morfoespecie se logró reaislar el mismo hongo a partir de las lesiones, lo cual confirmó que se trató del mismo hongo inoculado (Figura 12).

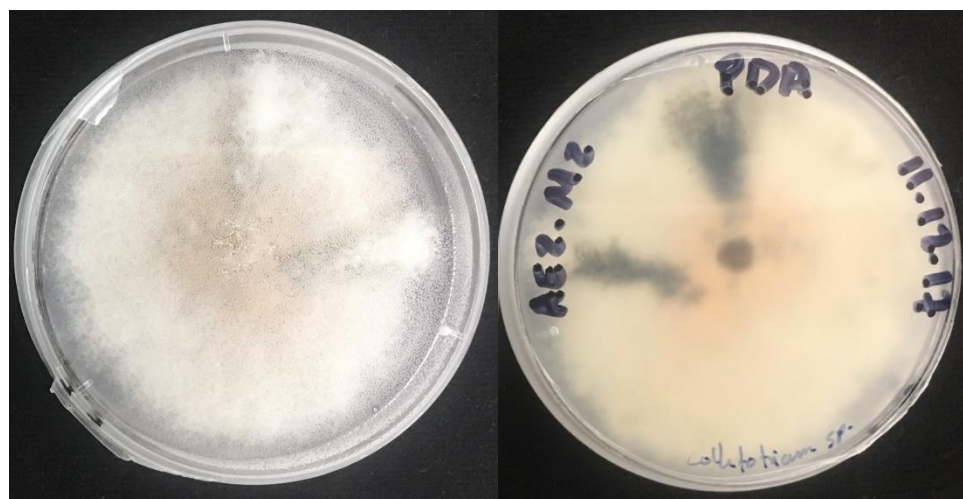


Figura 12. Reaislamiento de morfoespecie AE2.2.

3.3. Pruebas de patogenicidad *in vivo*

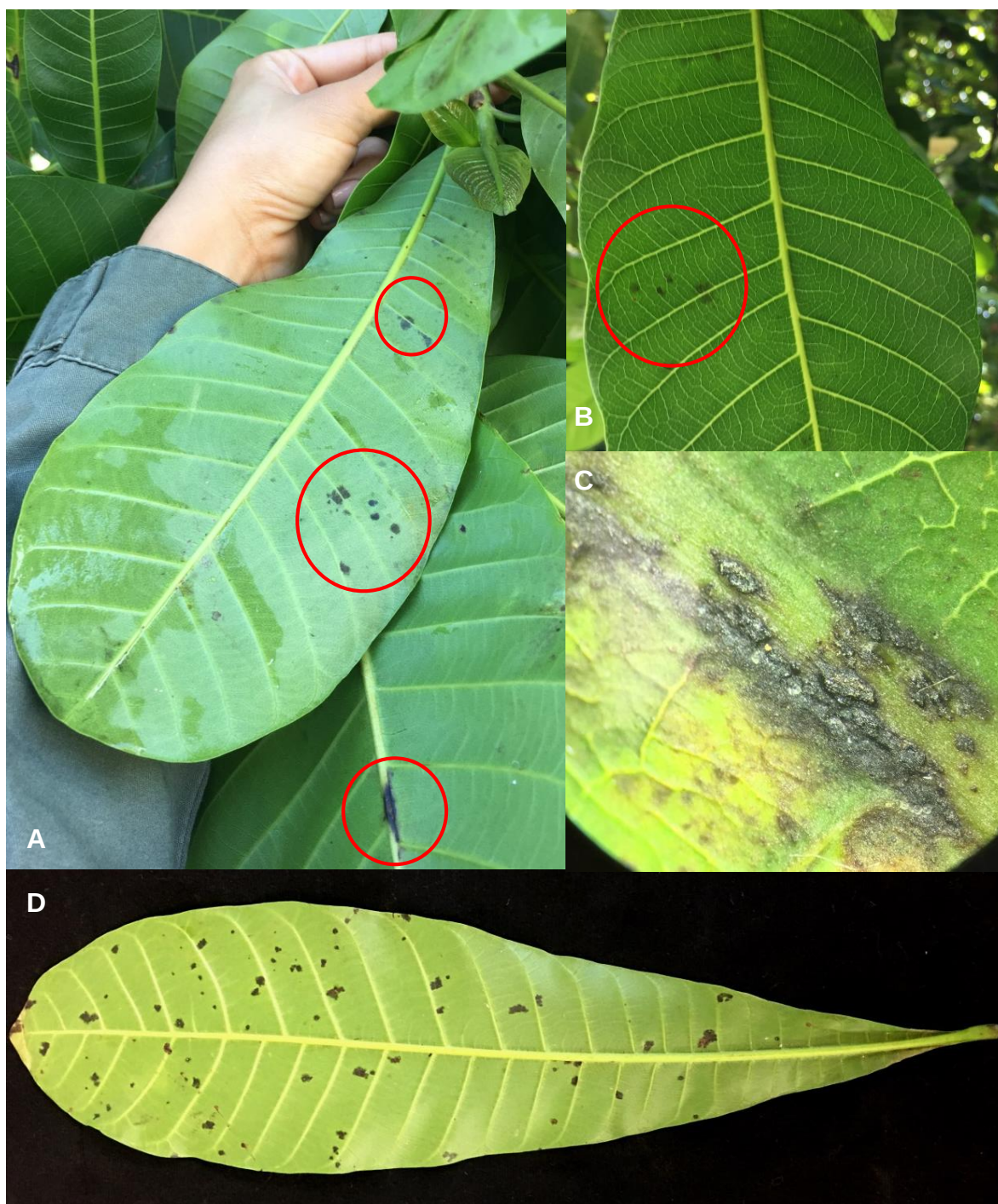


Figura 13. Comparación de lesiones *in vivo*, obtenidas mediante inoculación de árbol experimental de *A. excelsum*, contra lesiones de árbol sujeto de estudio donde se observaron los síntomas originales. A-B) Lesiones obtenidas luego de haber inoculado las hojas con esporas de morfoespecie AE2.2. del árbol de estudio ubicado en Clayton. C) Lesión en nervadura del árbol en estudio ubicado en la Universidad de Panamá, vista en estereoscopio. D) Hoja con lesiones del árbol en estudio ubicado en la universidad de Panamá.

La inoculación de conidias de la morfoespecie AE2.2 bajo condiciones *in vivo* en individuos sanos resultó en la formación de lesiones similares a las observadas en el individuo de *A. excelsum*, de donde se observaron los síntomas iniciales y donde se reisló la cepa. Se observa que en las hojas inoculadas con morfoespecie AE2.2 las lesiones iniciales son radiales de color marrón, también se obtuvieron lesiones en el área de la nervadura. Las lesiones empezaron generándose en la cara abaxial como se muestra en la figura 13-B.



Figura 14. Hojas control de prueba *in vivo*.

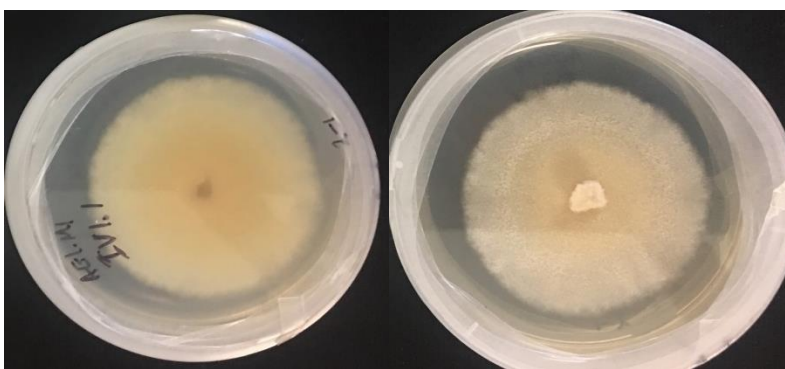


Figura 15. Reaislamiento del hongo patógeno de la prueba *in vivo*.

3.4. Descripción morfológica del patógeno

En cultivo: El crecimiento de la morfoespecie AE2.2 en PDA a 25°C se caracterizó por presentar al inicio micelio aéreo abundante blanco y luego de gris a gris oscuro. A partir del décimo día los cultivos de esta morfoespecie presentaron masa conidial viscosa de color naranja (Figura 16-B).

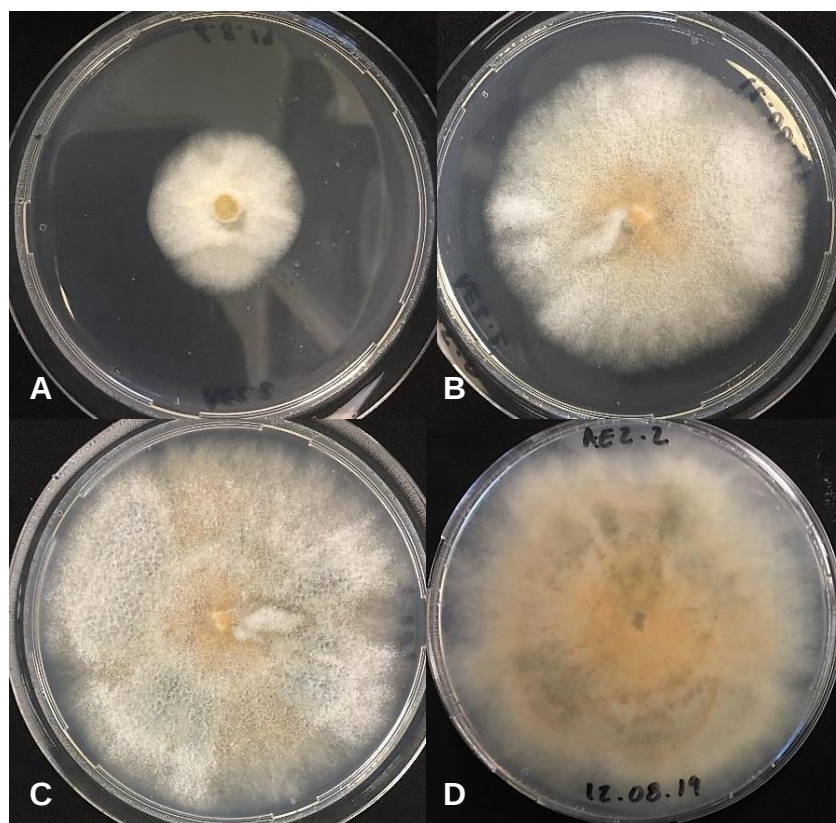


Figura 16. Crecimiento de *Colletotrichum tropicale*. AE2.2 en PDA. A) Cepa con cinco días de crecimiento. B) Cepa con 10 días de crecimiento. C) Cepa con 15 días de crecimiento D) Parte reversa.

Estructuras microscópicas (Figuras 17 y 18). Las conidias de morfoespecie AE2.2 se caracterizaban por ser sub-cilíndricas con extremos redondeados, con un rango de tamaño de 11,9 - 15,4µm de largo x 4,5 – 5,2µm de ancho (N= 62). Células conidiógenas cilíndricas, monoblásticas, con puntas engrosadas que surgen de una base delgada de textura epidermoidea. Apresorios irregulares, redondeados y clavados, de color pardo e hifas septadas. Otra estructura que se observó fueron acérvulos, que en su interior contenían setas, pero sólo se encontraron en los bordes de la nervadura de hojas enfermas, sin embargo, sí se observó presencia de setas miceliales en las lesiones generadas en las pruebas *in vitro*.

Las características morfológicas de la morfoespecie AE2.2 correspondieron con las del género *Colletotrichum*. *Colletotrichum* es un género que abarca a los principales patógenos vegetales de antracnosis en todo el mundo (Cai et al. 2009; Hyde et al. 2009; De Silva et al. 2017; Weir, Johnston, and Damm 2012).

Tradicionalmente las especies de *Colletotrichum* se identificaban en base a características morfológicas y de cultivo, características que pueden llegar a perderse o cambiar debido al subcultivo repetido (Weir, Johnston, and Damm 2012). Las características morfológicas pueden ser influenciadas por factores ambientales y pueden ser altamente variables (Cannon, et al. 2000); como lo son los apresorios; que están sujetos a evolución convergentes y no son predictivos de las relaciones filogenéticas (Crouch et al. 2009).

En Cai et al. (2009), se citaron varios estudios que reconocen la gran importancia de tomar en cuenta características morfológicas, autores como: Du et al. (2005) lograron diferenciar *C. acutatum* de *C. gloeosporioides* por estructuras como el apresorio, ya que en el primero se presentaban con un margen bastante suave y en el otro eran lobulados. Crouch et al. (2009)

mencionan que con la forma y tamaño de apresorios pudieron determinar las especies de *Colletotrichum* asociadas al pasto, en combinación con el rango de hospedero y análisis moleculares. Yang et al. (2009) pudieron distinguir entre *C. hippeastri* y *C. hymenocallidis* de Amaryllidaceae a través de los apresorios conidiales. También por características de cultivo en agar, Baxter, van der Westhuizen, and Eicker (1983) reportaron que la morfología conidial de *C. gloeosporioides* es similar a la de *C. lindemuthianum*, en cambio en medio de cultivo son muy diferentes, ya que *C. lindemuthianum* produce pigmentación oscura y su crecimiento es más lento que en *C. gloeosporioides*.

Los caracteres morfológicos deben evaluarse y usarse con cautela ya que dependen, en gran parte, a las condiciones de crecimiento (Cai et al. 2009). Estos podrían ser usados para elaborar claves informativas de identificación dicotómica, cuando un estudio profundo de relaciones evolutivas, criterios taxonómicos y nomenclatura se hayan derivado satisfactoriamente de la sistemática molecular (Crouch et al. 2009).

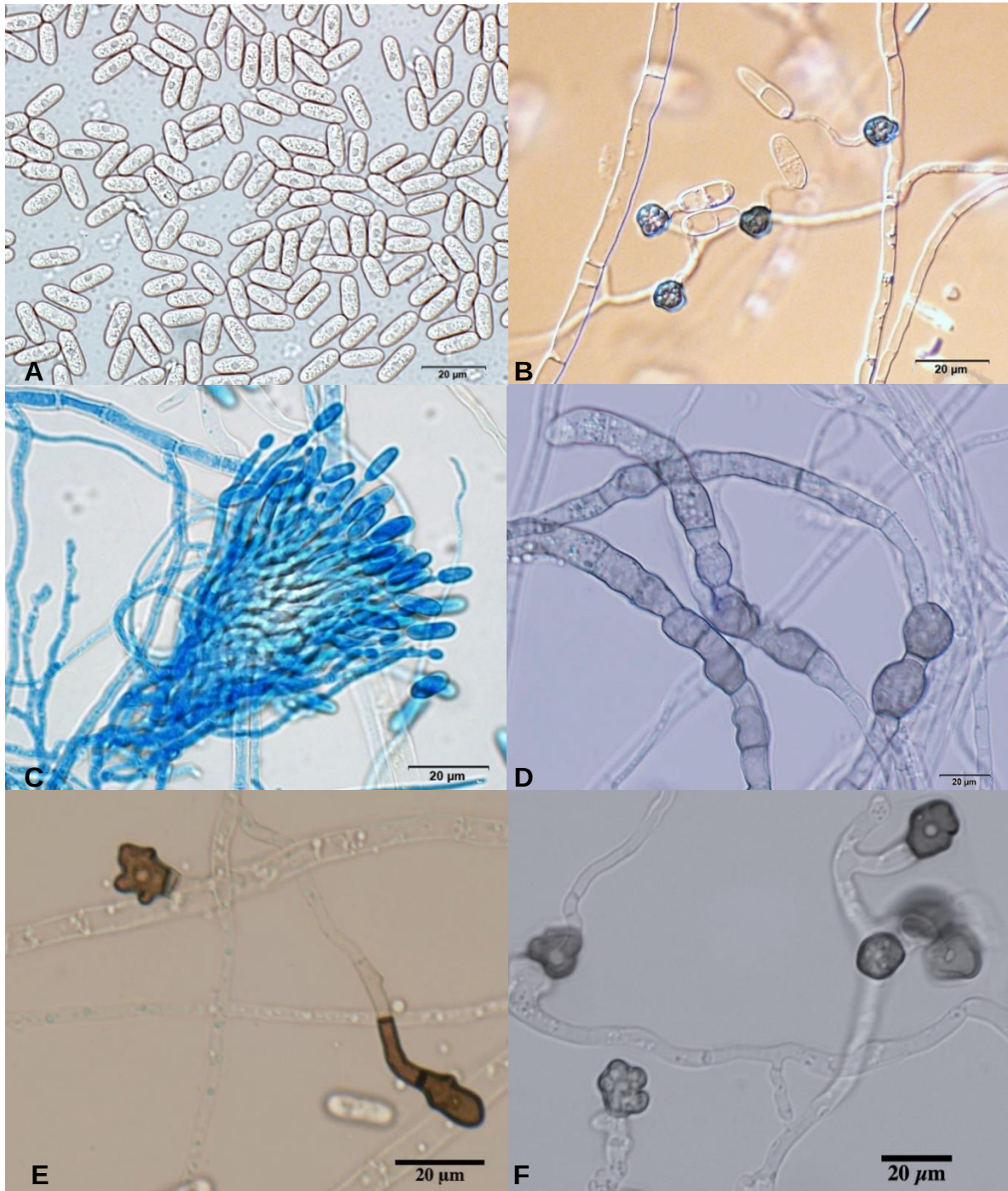


Figura 17. Estructuras microscópicas de *Colletotrichum tropicale* AE2.2 en PDA. A) Conidias. B) Germinación de conidiospora y formación de apresorios. C) Células conidiogénicas (coloración: azul de lactofenol). D) Vesícula de infección lobulada y multiseptada. E, F) apresorios. Barras: A-F = 20µm

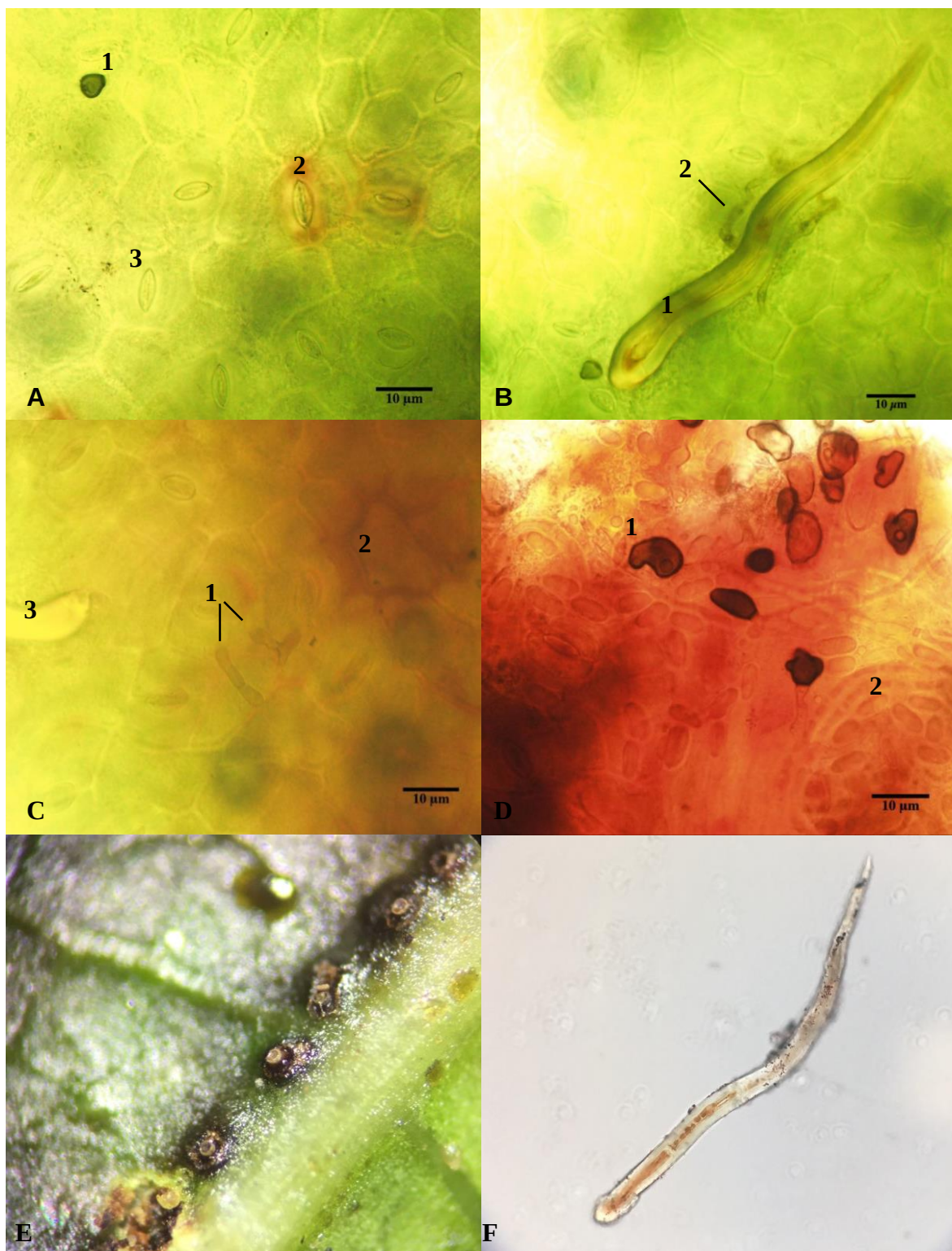


Figura 18. Signos del patógeno en hojas. A-D) Estructuras observadas en lesiones de hojas, pruebas *in vitro*, 10µm. A) 1. Apresorios; 2. Estomas que presentan inicio de patogenicidad. 3. Estomas sanos. B) 1. Seta; 2 Haustorio. C) 1. Haustorio - 2. Célula infectada; 3. Seta. D) 1. Apresorio; 2. Conidiosporas. E,F) E) Acérvulos de *Colletotrichum* sp. en tejido foliar. F) Seta aislada de acérvulo.

Las herramientas moleculares son de gran ayuda en la identificación de especies de *Colletotrichum* (Cai et al. 2009). Estudios basados en filogenia multilocus, han demostrado que las especies con características morfológicas similares pueden tener una variación considerable en las relaciones evolutivas. La filogenética molecular multilocus es un complemento esencial de los caracteres morfológicos y criterios de asociación del hospedero para la definición de los límites de las especies de *Colletotrichum* (Crouch et al. 2009).

En los últimos años se han incorporado análisis filogenéticos de regiones ribosomales (ITS) y que codifican para proteína (β -tubulina) como aspecto fundamental para la identificación de especies dentro del género *Colletotrichum*. Ya que habitan en un amplio rango de hospedero desarrollando relaciones únicas con hospederos específicos que no siempre se asocian con enfermedades. La presencia asintomática en algunos hospederos puede intervenir en inóculo infeccioso a otras plantas cercanas (S. Freeman, Horowitz, and Sharon 2001; Yang et al. 2009). *Colletotrichum* spp. presentan múltiples estilos de vida, que van a depender de especies dentro del género, hospedero y su madurez fisiológica; así como de las condiciones ambientales (De Silva et al. 2017). Los estilos de vida que adoptan *Colletotrichum* spp. son clasificados en términos generales como: necrotrófos, hemibiótrofos (el más común), latentes o inactivos y endofíticos (Münch et al. 2008; De Silva et al. 2017). No se sabe si estos modos ecológicos contrastantes son estrategias opcionales expresadas por especies individuales o si la ecología de una especie es explícitamente patógena o endofítica (Rojas et al. 2010). Una correcta identificación de las especies de *Colletotrichum* tiene importancia para la bioseguridad, fito-mejoramiento y el manejo integrado de enfermedades (De Silva et al. 2017). Los complejos ciclos de vida de especies de *Colletotrichum* y su

capacidad para infectar de manera cruzada múltiples especies hospederas, crean dificultades para controlar las enfermedades que causan (Phoulivong 2012; De Silva et al. 2017).

La dificultad para reconocer las especies de *Colletotrichum* deriva de: pocos caracteres morfológicos y variables, extenso rango de hospederos, y variabilidad en la patogenicidad (Du et al. 2005). También dificultad de estudios moleculares en cuanto a la ausencia o mala condición de las muestras tipo, y falta de base de datos disponible de secuencias de ADN con identificación taxonómica analizadas por expertos o confiable (Cai et al. 2009).

3.5. Extracción y secuenciación de ADN

Las concentraciones de las extracciones de ADN se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Concentración y pureza de extractos de ADN.

Cepas	[ADN] ng/μL	Proporción 260/280 de ácidos nucleicos	Proporción 260/230 de ácidos nucleicos
AE1.1	123,8	1,81	0,82
AE1.2	15,6	1,90	0,27
AE1.3	32,0	1,91	0,50
AE1.4	63,3	2,08	0,75
AE1.5	24,3	1,98	0,42
AE2.1	20,9	1,97	0,37
AE2.2	121,3	1,87	0,78
AE2.3	36,4	1,95	0,47
AE2.4	126,3	1,88	0,91

Los resultados de la secuenciación de las regiones ITS para las morfoespecies aisladas y comparación en la base de datos NCBI Genbank indican que se aislaron las siguientes

especies de hongos en base a la identidad de la secuencia de mayor similitud: *Nemania abortiva* (AE1.1), *Diaporthe pseudomangiferae* (AE1.2 & AE2.4), *Diaporthe ueckerae* (AE1.3), *Diaporthe phaseolorum* (AE1.4), *Phyllosticta elongata* (AE1.5), *Pestalotiopsis* sp. (AE2.1), *Colletotrichum gloeosporioides* (AE2.2) y *Phomopsis* sp. (AE2.3). Sugiriendo que el agente causal de antracnosis, morfoespecie AE2.2, del *Anacardium excelsum* es *Colletotrichum gloeosporioides* (cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de cepas de hongos aislados en lesiones de hoja basado en similitud de secuencias ITS. La tabla presenta el resultado con más similitud de secuencia en la base de datos GenBank® usando BLAST®.

Cepa	Especie	Familia	Orden	Cobertura	Valor E	identidad
AE1.1	<i>Nemania abortiva</i>	Xylariaceae	Xylariales	99%	0.0	97.60%
AE1.2	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	Diaporthaceae	Diaporthales	98%	0.0	99.83%
AE1.3	<i>Diaporthe ueckerae</i>	Diaporthaceae	Diaporthales	97%	0.0	99.15%
AE1.4	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Diaporthaceae	Diaporthales	99%	0.0	98.51%
AE1.5	<i>Phyllosticta elongata</i>	Botryosphaeriaceae	Botryosphaeriales	99%	0.0	99.85%
AE2.1	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Amphisphaeriaceae	Xylariales	100%	0.0	100%
AE2.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Glomerellaceae	Glomerellales	99%	0.0	99.50%
AE2.3	<i>Phomopsis</i> sp.	Valsaceae	Diaporthales	97%	0.0	100%
AE2.4	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	Diaporthaceae	Diaporthales	97%	0.0	100%

A partir de filogenias de múltiples genes se ha encontrado que especies como *Colletotrichum gloeosporioides* pertenecen a un complejo de especies que contienen una serie de subgrupos con diferentes grados de patogenicidad, especificidad y diversidad genética, lo cual hace muy difícil su identificación (Cai et al. 2009; Du et al. 2005; Stanley Freeman, Katan, and Shabi 1998; Hyde et al. 2009). Las relaciones biológicas y genéticas dentro del amplio clado del complejo *C. gloeosporioides* permanecen confusas y las secuencias de ITS por sí solas son insuficientes para resolverlas (Weir, Johnston, and Damm 2012). Debido a esto, se procedió a secuenciar los genes β -tubulina y el factor de elongación de la traducción (TEF1 α).

Para afirmar de que se trataba de esta especie, se procedió a secuenciar TEF1 α , ya que el análisis de esta región permite establecer relaciones filogenéticas y mejorar la identificación a nivel de especies. El resultado del análisis de esta secuencia indica una alta identidad con *Colletotrichum tropicale*, una de las especies del complejo *C. gloeosporioides* (cuadro 6), especie descrita como endófita en Rojas et al. (2010) por primera vez, en Panamá.

Cuadro 6. Resultado de comparación de secuencias de ADN del locus TEF1- α de morfoespecie AE2.2 contra secuencias de ADN en la base de datos GenBank®.

Locus	Especie	*Cobertura	Valor E	% identidad	Número de acceso
TEF1-α	<i>Colletotrichum tropicale</i>	50%	0.0	100	GU994482.1
	<i>Colletotrichum tropicale</i>	50%	0.0	100	GU994481.1
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	50%	0.0	99.7	GU994503.1
	<i>Colletotrichum ignotum</i>	50%	0.0	99.7	GU994501.1
	<i>Colletotrichum sp.</i>	50%	0.0	99.7	GU994493.1
	<i>Colletotrichum tropicale</i>	50%	0.0	99.7	GU994488.1
	<i>Colletotrichum tropicale</i>	50%	0.0	99.7	GU994486.1
	<i>Colletotrichum tropicale</i>	50%	0.0	100	GU994240.1

*El porcentaje de cobertura es de 50% debido a que se secuenció una región más corta a la comparada con especies que se encuentran disponible en la base de datos del GenBank®.

Interacciones entre la planta huésped y el hongo endófito pueden cambiar de mutualista – antagonista a antagonista – patógeno, lo que dependerá de la condición fisiológica de la planta, genotipo del hospedero y de las condiciones ambientales (De Silva et al. 2017). Delaye (2013), indica que, en la evolución de las interacciones fúngicas, la mayoría de las especies endófitas eran filogenéticamente cercanas a las especies con estilos de vida necrotrófico y en la mayoría de los linajes fúngicos las especies habían cambiado entre endófitas y necrotróficas varias veces en la escala del tiempo evolutivo y ecológico.

Recientemente se ha encontrado incidencia de *C. tropicale* afectando diversos cultivos como: *Annona muricata* (guanábana) en Colombia (Álvarez et al. 2014); *Annona cherimola* (chirimoya) en Cuba (García and Manzano 2017); *Copernicia prunifera* (carnaúba) en Brasil (Araújo et al. 2017) y en *Morinda citrifolia* (noni) en México (Ayvar Serna et al. 2018).

Se le atribuye a *C. tropicale* un ciclo de vida hemibiotrófico, ya que muchas especies de *Colletotrichum* en su estilo de vida temprano presentan una etapa biotrófica, seguida de un cambio a un estilo de vida necrotrófico (De Silva et al. 2017). Este cambio es variado dependiendo de la etapa del desarrollo del hospedero y de las condiciones ambientales (Arroyo et al. 2005; De Silva et al. 2017).

Colletotrichum spp. generalmente no presentan una etapa biotrófica verdadera, ya que se les atribuye más a los hongos que deben completar su ciclo de vida dentro del tejido vivo del hospedero (De Silva et al. 2017), sino que se caracteriza por una etapa biotrófica más o menos prolongada antes de cambiar su crecimiento a necrotrófico (Perfect and Green 2001; Voegelé and Mendgen 2011).

C. tropicale en etapa biotrófica establece una interacción compatible con su huésped por medio de una célula de infección especializada (apresorios) que penetra en la célula epidérmica vegetal formando una vesícula de infección e hifas primarias, en esta etapa el tejido vegetal no es afectado. En etapa necrotrófica desarrolla hifas de infección secundarias que provoca la muerte de la célula del huésped.

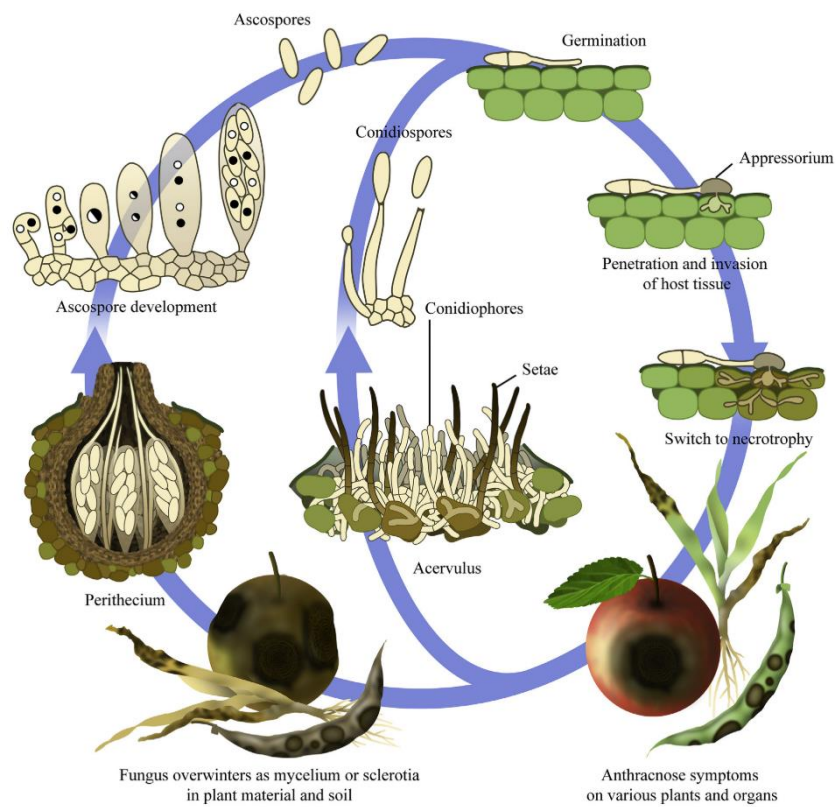


Figura 19. Ciclo de vida general de especies de *Colletotrichum*. De Silva et al. (2017). Fungal Biology Reviews.

3.6. Análisis filogenético

Para lograr una identificación filogenética del agente causal de los síntomas de antracnosis observados, se realizó un análisis de máxima verosimilitud (“Maximum Likelihood”) de los loci β -tubulina e ITS concatenados para especies del complejo *C. gloeosporioides* (Weir 2012). Este tipo de análisis multilocus es necesario para identificar especies de *Colletotrichum* ya que los caracteres morfológicos por sí solo no nos permiten identificar las especies. Adicionalmente, el uso de un solo locus usualmente no permite la identificación de especies de *Colletotrichum*, por ejemplo: la región ITS del ADNr es poco informativa, y no permite diferenciar especies del complejo *C. gloeosporioides*.

En esta filogenia aparecen 22 especies del complejo *C. gloeosporioides* y a pesar de que los valores bootstrap en general no son tan altos para definir las relaciones entre especies hermanas, se obtuvo que las secuencias de la cepa AE2.2 aislada de lesiones tipo antracnosis de *A. excelsum* se agrupó con secuencias del espécimen CBS124949 que representa el holotipo de *C. tropicale*, aislado comúnmente como endófito de *Theobroma cacao* en Panamá (Rojas et al 2010, Mejía et al. 2014). Los resultados del análisis combinado de la morfología del hongo y filogenia indican que el agente causal de la antracnosis observada en el árbol de *A. excelsum* estudiado es *Colletotrichum tropicale* Rojas, Rehner, and Samuels (Glomerellaceae).

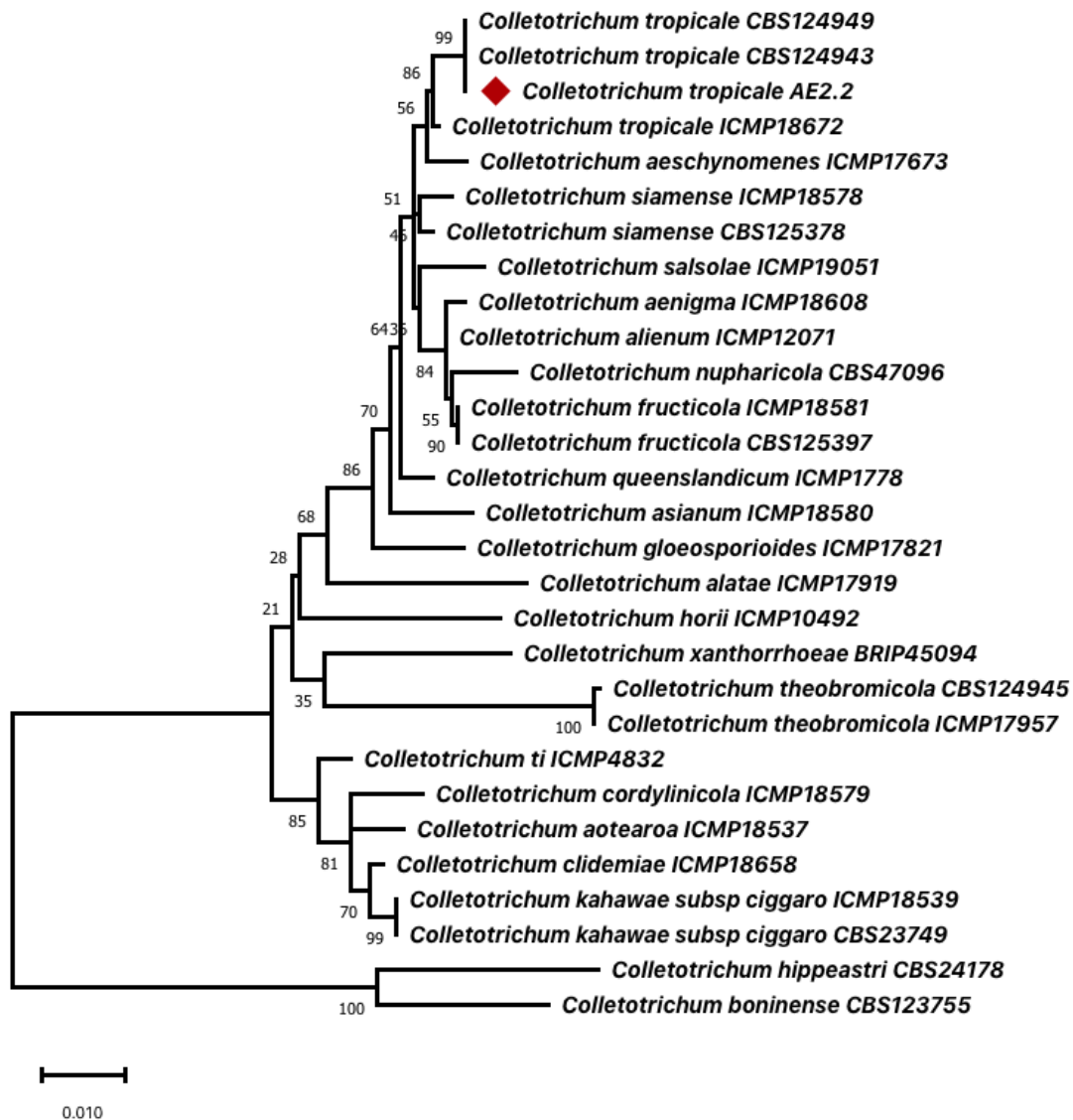


Figura 20. Filogenia basada en análisis de máxima verosimilitud (“Maximum Likelihood”) de los loci ITS y β -tubulina para especies del complejo *Colletotrichum gloeosporioides*, usando *C. boninense* y *C. hippeastri* como grupo externo. Los números arriba de las ramas indican valores de bootstrap posterior a 1000 réplicas. Nótese la ubicación filogenética del aislado morfoespecie AE2.2 que corresponde con *C. tropicale*.

3.7. Pruebas de antagonismo

De las 27 cepas que se probaron, se tomaron en cuenta 17 cepas de los hongos endófitos que contrarrestaron el crecimiento del patógeno. Estos se clasificaron de dos maneras: la primera fue en base a la competencia que mostraron en PDA, los cuales se clasificaron en interacciones por competencia de sustrato (CxS) y la segunda por la capacidad de inhibir al patógeno en medio PDA, siendo clasificado como antibiosis (IxA). De las 27 cepas el 51,85% (15 cepas) mostraron mayor competencia por sustrato que *C. tropicale* y 7,41% (2 cepas) antibiosis. El grupo de control para el patógeno, al día cinco, creció hasta 25,05cm². Interacciones de *C. tropicale* con endófitos de *Coffea arabica* se presentan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Mediciones de interacciones cinco días después de iniciar la interacción. Se muestran las 17 cepas que mostraron mayor competencia por el sustrato que *C. tropicale* o que inhibieron el crecimiento de este hongo.

Endófito	Cepa	CPA cm²	CPE cm²	% RCP	Tipo de interacción
<i>Colletotrichum prifoliae</i>	CA710	25.05	14.89	40.56	CxS
<i>Colletotrichum karstii</i>	CA976	25.05	13.88	44.59	CxS
<i>C. karstii</i>	CA982	25.05	18.27	27.07	CxS
<i>C. karstii</i>	CA1115	25.05	17.23	31.21	CxS
<i>C. karstii</i>	CA1266	25.05	17.20	31.34	CxS
<i>C. karstii</i>	CA1271	25.05	14.09	43.75	CxS
<i>Colletotrichum siamense</i>	CA1272	25.05	16.28	35.00	CxS
<i>C. karstii</i>	CA1274	25.05	15.41	38.48	CxS
<i>Diaporthe caatingaensis</i>	CA1290	25.05	19.38	22.63	CxS
<i>Xylaria enteroleuca</i>	CA1310	25.05	19.07	23.87	CxS
<i>Phomopsis</i> sp.	CA1438	25.05	16.08	35.80	CxS
<i>C. karstii</i>	CA1443	25.05	17.64	29.58	CxS
<i>Xylaria</i> sp.	CA1520	25.05	20.22	19.28	IxA
<i>C. gloeosporioides</i>	CA1569	25.05	12.49	50.14	CxS
<i>Phoma</i> sp.	CA1597	25.05	22.61	9.74	IxA
<i>C. gloeosporioides</i>	CA1600	25.05	14.82	40.83	CxS
<i>C. vietnamense</i>	CA1843	25.05	16.84	32.77	IxA

La mayor cantidad de endófitos probados fueron del género *Colletotrichum*, 44,44% (Cuadro 7). Hongos de este género, incluso del complejo *C. gloeosporioides*, forman parte del grupo de endófitos más abundantes en *C. arábica*, al estar en constante contacto y reconocer algunas especies de este género les da capacidad de superar estrategias naturales del patógeno (Oliveira 2014; Santamaría and Bayman 2005; Vega et al. 2010).

La mayoría de las especies de *Colletotrichum* que se reportan como endófitas, se encuentran dentro de los complejos de especies *C. gloeosporioides*, *C. graminícola* y *C. boninense* (Weir, Johnston, and Damm 2012). Muchas especies existen como endófitas en una parte o en la mayoría de sus ciclos de vida en un alto rango de plantas (Rojas et al. 2010). Los patrones en el estilo de vida de *Colletotrichum* están regulados por familias de genes específicos e interacciones bioquímicas que ocurren a través de enzimas específicas y metabolitos secundarios producidos en la interacción hospedero – patógeno, cada especie tiene perfiles personalizados de enzimas de acuerdo a su estilo de vida específico (De Silva et al. 2017).

La competencia por sustrato es importante en la limitación de enfermedades debido a que los microorganismos conviven en su mayoría, compitiendo por sustratos en el ambiente que habitan, la selección de un antagonista va en base a la capacidad para colonizar y persistir en el sustrato, al igual que superar la habilidad del patógeno para la obtención de nutrientes y resistencia (Hernández-Lauzardo et al. 2007; Wisniewski and Wilson 1992).

En la figura 21 se muestra el rango de crecimiento de *C. tropicale* en las interacciones frente a los endófitos selectos.

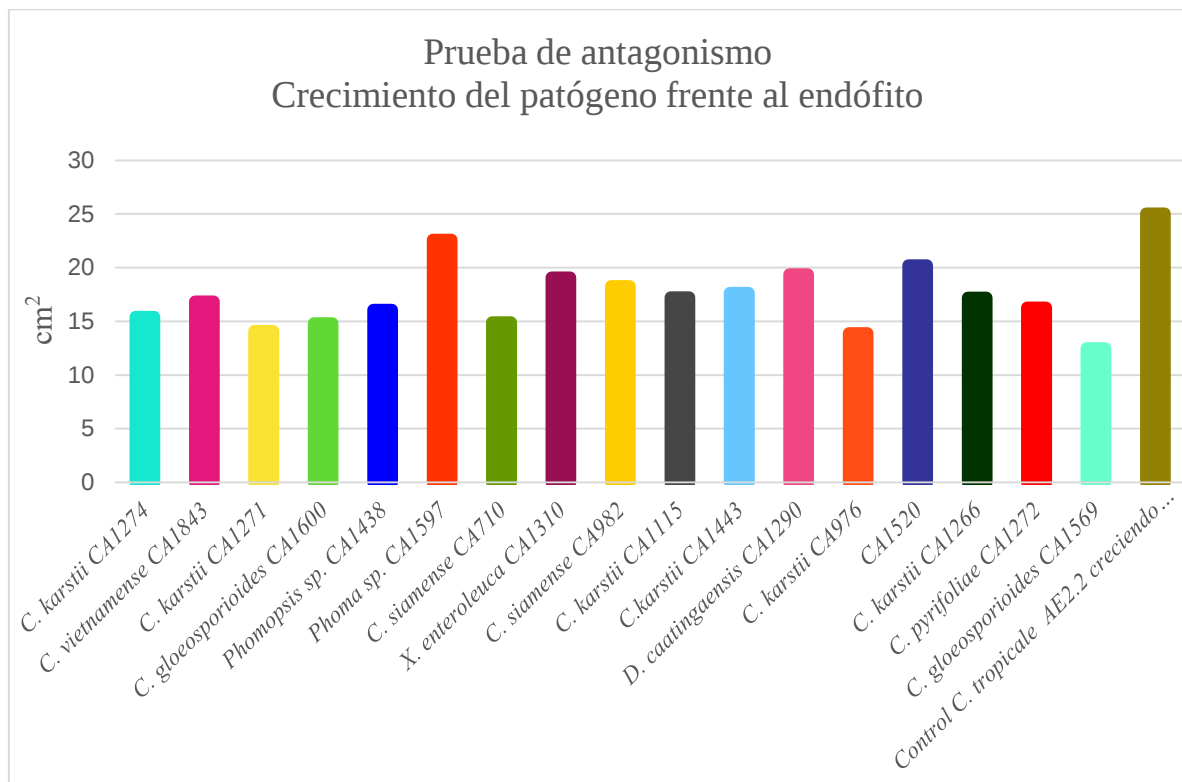


Figura 21. Crecimiento de *C. tropicale* AE2.2 en presencia de hongos endófitos selectos.

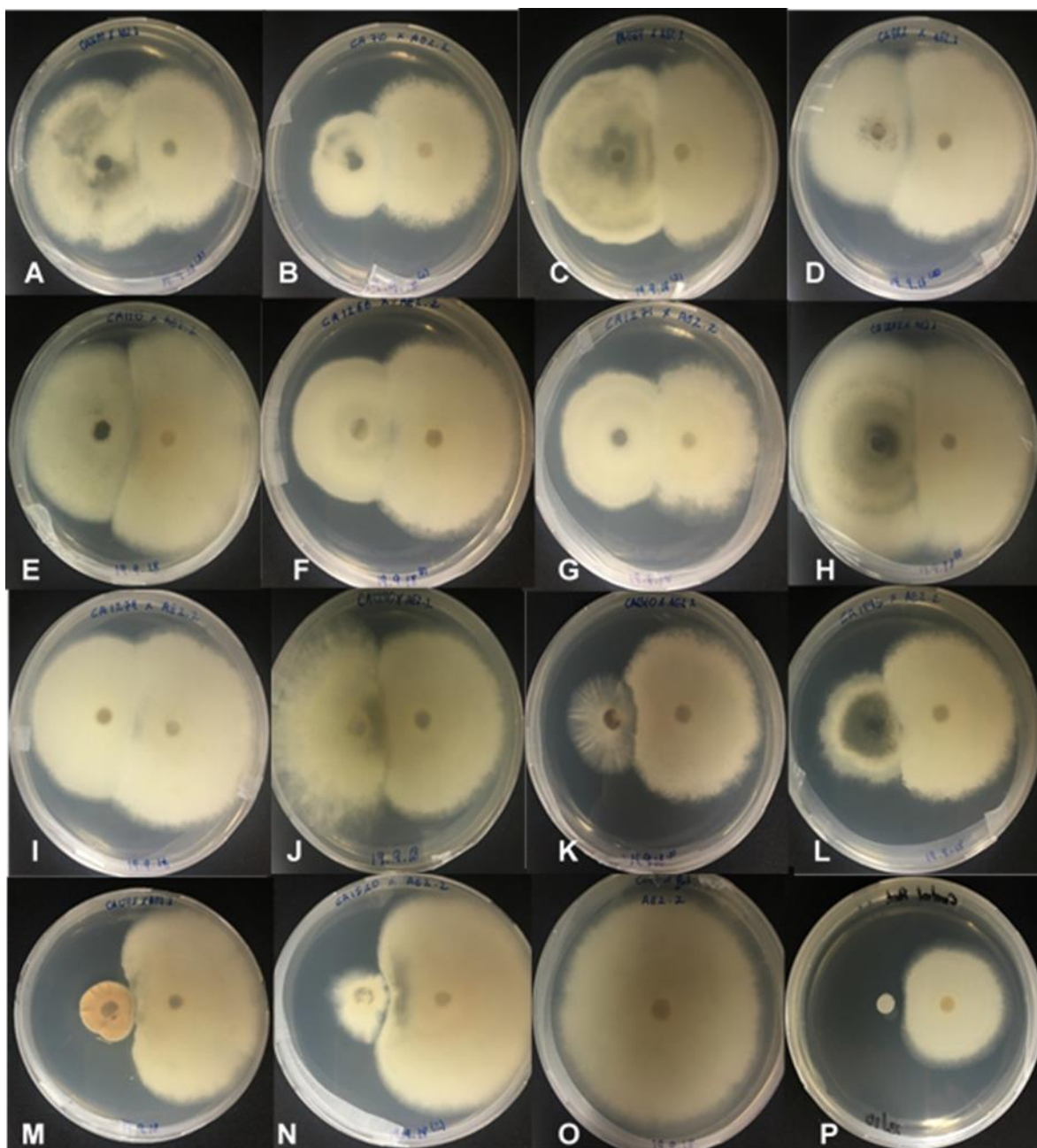


Figura 22. Interacciones *in vitro* de *Colletotrichum tropicale* AE2.2 contra hongos endófitos selectos. A-N) A la izquierda del plato Petri, hongo endófito. A la derecha, hongo patógeno. A) *Colletotrichum gloeosporioides* CA1600O. B) *C. siamense* CA710. C) *C. gloeosporioides* CA1569. D) *C. siamense* CA982. E) *C. karstii* CA1115. F) *C. karstii* CA1266. G) *C. karstii* CA1271. H) *C. pyrifoliae* CA1272. I) *C. karstii* CA1274. J) *Diaporthe caatingaensis* CA1290. K) *Xylaria enteroleuca* CA1310 L) *C. vietnamense* CA1843. M) *Phoma* sp. CA1597. N) *Xylaria* sp. CA1520. O) Control patógeno. P) Control positivo.

CONCLUSIONES

- *Colletotrichum tropicale* es el agente causal de síntomas de antracnosis observado en el árbol de *Anacardium excelsum* estudiado. Cabe destacar que se desconoce las condiciones que llevaron al desarrollo de estos síntomas en este árbol y la incidencia de estos síntomas en poblaciones de *A. excelsum* ya que, a pesar de haber observado árboles de esta especie en muchas localidades de Panamá, solo se encontró el grado de sintomatología avanzado en este árbol en la Universidad de Panamá.
- Especies endófitas tienen potencial de competir por sustrato contra *Colletotrichum tropicale* e inhibir su crecimiento.

RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de patogenicidad con la cepa aislada de *C. tropicale* en diferentes árboles tropicales para determinar su rango de hospedero y si una misma cepa de esta especie puede ser patogénica en un hospedero y no patogénica en otro.
- Utilizar plántulas de *Anacardium excelsum* para inoculaciones *IN VIVO* y observar cómo se da el ciclo de infección en periodos largos en toda la planta.
- Realizar estudios de microscopia de fluorescencia de los procesos de infección de *C. tropicale*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHICANO, L.H, 2001. “Estrategias Integradas Para El Control de Enfermedades de Las Plantas.” *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 54: 1251–73.
2. AGRIOS, G.N. 2005. *Fitopatología*. 2da Edición. México: Limusa.
3. AGUÍN, O. et al. 2001. “La Reacción En Cadena de La Polimerasa (PCR) Como Técnica de Diagnóstico En Fitopatología Forestal.” III Congreso Forestal Español - 25 al 28 de septiembre 2001. Sierra Nevada. Granada
4. AUGUÍN, O. el al. 2005. “Distribución y Diversidad de Los Tipos de Compatibilidad Vegetativa de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr En Castaños de Castilla y León.” 1947: 287–97.
5. AL-SAGHIR, M.G, 2009. Evolutionary history of the genus *Pistacia* (Anacardiaceae). *International Journal of Botany* 5(3): 255-257.
6. ALTSCHUL, S.F., et al. 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, Volume 25, Issue 17, 1 September 1997, Pages 3389–3402, <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
7. ÁLVAREZ, E., GAÑÁN, L., ROJAS-TRIVIÑO, A. et al., 2014. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *Eur J Plant Pathol* **139**, 325–338. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0388-7>
8. Ambiente, Departamento De, Agua Energía, and Equipo De Sensores Remotos. 2007. *2 Autoridad Del Canal de Panamá Manual de Reforestación: Especies Maderables Tradicionales Cuenca Hidrográfica Del Canal de Panamá*. Panamá.
9. ARAÚJO, M.B.M. et al. 2017. “First Report of *Colletotrichum theobromicola* and *C. tropicale* Causing Anthracnose on Fruits of Carnauba Palm in Brazil.” *Plant Disease* 102(1): 244.
10. ARROYO, F.T. et al. 2005. “Ultrastructure of the Early Stages of *Colletotrichum acutatum* Infection of Strawberry Tissues.” *Canadian Journal of Botany* 83(5): 491–500.
11. AYVAR SERNA, S. et al. 2018. “*Colletotrichum tropicale* Causal Agent of Anthracnose on Noni Plants (*Morinda Citrifolia*) in Guerrero, Mexico.” *Plant Pathology Quarantine*.
12. BATLLE, A., PÉREZ L. 2009. “Variabilidad Genética de Las Poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* En Bananos y Plátanos de Cuba.” *Fitosanidad*

- 13(3).
13. BAXTER, A. P., VAN DER WESTHUIZEN G.C.A., and EICKER A. 1983. "Morphology and taxonomy of South African Isolates of *Colletotrichum*." *South African Journal of Botany* 2(4): 259–89.
 14. BioMuseo. 2011. "Árboles Nativos de Panamá y El Neotrópico." *La Prensa, S.A.*
 15. CAI, L et al. 2009. "A Polyphasic Approach for Studying *Colletotrichum*." *Fungal Diversity* (39): 183–204.
 16. CANNON, P.F., BRIDGE, P.D., and MONTE E. 2000. "Linking the Past, Present, and Future of *Colletotrichum* Systematics." In *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host–Pathogen Interaction.*, eds. Dov Prusky, Stanley Freeman, and Martin B. Dickman. St Paul, MN, USA: APS Press, 1–20.
 17. CARBONE I. & KOHN L.M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
 18. CARRASQUILLA, L.G. 2008. *Árboles y Arbustos de Panamá*. 2. ed. Panamá: Editora Novo Art.
 19. CHÍZMAR, C., LU, A., CORREA M., and J. MORALES J.F., 2009. *Plantas de Uso Folclórico y Tradicional En Panamá*.
 20. CHÍZMAR, C. [et al.]. 2009. *Plantas Comestibles de Centroamérica*. 1ª ed.
 21. CROUCH, J.A., CLARKE, B.B., WHITE, J.F., and HILLMAN, B.I., 2009. "Systematic Analysis of the Falcate-Spored Graminicolous *Colletotrichum* and a Description of Six New Species from Warm-Season Grasses." *Mycologia* 101(5): 717–32.
 22. DEAN, R. et al. 2012. "The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology." *Molecular Plant Pathology* 13(4): 414–30.
 23. DELAYE, L., GARCÍA-GUZMÁN, G., and HEIL M. 2013. "Endophytes versus Biotrophic and Necrotrophic Pathogens Are Fungal Lifestyles Evolutionarily Stable Traits?" *Fungal Diversity* 60(1): 125–35.
 24. DE SILVA, D. et al. 2017. "Life Styles of *Colletotrichum* Species and Implications for Plant Biosecurity." *Fungal Biology Reviews* 31(3): 155–68.
 25. DU, M., SCHARDL, C.L., NUCKLES, E.M., and VAILLANCOURT, L.J., 2005. "Using Mating-Type Gene Sequences for Improved Phylogenetic Resolution of

- Collectotrichum* Species Complexes.” *Mycologia* 97(3): 641–58.
26. ESQUIVEL R., E.A. 2011a., “Hongos Asociados Al Guandú (*Cajanus Cajan* (L.) Mill. En Panamá.” *Agrociencia Panamensis*. <http://agrociencia-panama.blogspot.com/2011/11/hongos-asociados-al-guandu-cajanus.html>.
 27. ESQUIVEL R., E.A. 2011b. “La Mancha Carbonosa de La Hoja Del Ñame (*Dioscorea Alata*) Causada Por *Pseudocercospora carbonacea* (Miles) N. Pons & B. Sutton En Panama.” *Agrociencia Panamensis*.
 28. FREEMAN, S., HOROWITZ, S., and SHARON, A., 2001. “Pathogenic and Nonpathogenic Lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from Strawberry and Other Plants.” *Phytopathology* 91(10): 986–92.
 29. FREEMAN, S., KATAN, T., and SHABI, EZRA., 1998. “Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits.” *Plant Disease* 82(6): 596–605.
 30. FREIRE, F.C.O., CARDOSO, J.E., DOS SANTOS, A.A., and VIANA, F.M.P., 2002. “Diseases of Cashew Nut Plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil.” *Crop Protection* 21(6): 489–94.
 31. FUJISAWA, N., TANAKA, M., and INOUE, M. 2012. “Flexibility of Coffee Agroforestry with Diversified Shade Tree Composition: A Case Study in Panama.” *Tropics* 21(2): 33–46.
 32. GARCIA, L., and MANZANO, A.M. 2017. “Species in the *Colletotrichum gloeosporioides* Complex on Fruits in Cuba.” *Submitted (09-MAY-2017) Mycology Laboratory, Research Institute in Tropical Fruit Crops, Ave 7 e/ 30 & 32, Playa. La Habana., CP 11300, CUBA*.
 33. GRACE, J., & BOLLEN, K. (2005). Interpreting the Results from Multiple Regression and Structural Equation Models. *Bulletin of the Ecological Society of America*, 86(4), 283-295. Retrieved October 25, 2020, from <http://www.jstor.org/stable/bullecociamer.86.4.283>.
 34. GULLUSCI, M., & TURINA, M. 2007. “Silencing of cryparin, a cell walls hydrophobin, in *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Plant Pathology*, Vol. 89, No. 1, Pp. 141-147 Published by: Società Italiana Di Patologia Veget.” 89(1): 141–47.
 35. HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N. et al. 2007. “Uso de Microorganismos

- Antagonistas En El Control de Enfermedades Postcosecha En Frutos.” *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 66–74.
36. HYDE, K.D. et al. 2009. “*Colletotrichum* - Names in Current Use.” *Fungal Diversity* (39): 147–83.
 37. JUÁREZ-BECCERRA, G.P., SOSA-MORALES, M.E., and LÓPEZ-MALO, A. 2010. “Hongos Fitopatógenos de Alta Importancia Económica: Descripción y Métodos de Control.” *Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Fundación Universidad de las Américas Puebla. Sta. Catamarina Mártir, Cholula, Puebla. C.P.72820 México* 4(2): 14–23.
 38. KHATOON, A., MOHAPATRA, A., and SATAPATHY, K.B., 2017. “Major Diseases of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Caused by Fungi and Their Control in Odisha, India.” *International Journal of Biosciences (IJB)* 11(1): 68–74.
 39. KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., & TAMURA, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
 40. MAEDA, C., & NELSON, S., 2014. “Anthracnose of Papaya in Hawai’i.” *College of Tropical Agriculture and Human Resources*.
 41. MEJÍA L.C., CASTLEBURY L.A., WHITE J.F., et al. 2011. “A systematic account of the genus *Plagiostoma* (Gnomoniaceae, Diaporthales) based on morphology, host-associations, and a four-gene phylogeny”. *Stud Mycol* 68:211–235
 42. MEJÍA, L.C., et al. 2014. Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. *Frontiers in microbiology*, 5, 479. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00479>
 43. MILLER, M.A., PFEIFFER, W. & SCHWARTZ, T., 2010. “2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010.” *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*.
 44. MOORE, N.Y., BENTLEY, S., PEGG, K.G., & JONES, D.R., 1995. “*Musa* Disease Fact Sheet N° 5 *Fusarium* Wilt of Banana.” *Inibap* 33(33): 4.
 45. MÜNCH, S. et al. 2008. “The Hemibiotrophic Lifestyle of *Colletotrichum* Species.” *Journal of Plant Physiology* 165(1): 41–51.
 46. MUNIZ, C.R. et al. 2011. “Colonization of Cashew Plants by *Lasiodiplodia*

- theobromae*: Microscopical Features.” *Micron* 42(5): 419–28.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2010.12.003>.
47. NEI M. & KUMAR S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
 48. NEWTON, A.C. et al. 2010. “Pathogenesis, Parasitism and Mutualism in the Trophic Space of Microbe–Plant Interactions.” *Trends in Microbiology* 18(8): 365–73.
 49. O'DONNELL K, CIGELNIK E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol.* Feb;7(1):103-16. doi: 10.1006/mpev.1996.0376. PMID: 9007025.
 50. OIRSA. 2009. “América Latina Discute Programa Para La Protección Del Cultivo Del Banano y Plátano.” *Mirador Agrosanitario* No. 3: 12.
 51. OLIVEIRA, RJV. 2014. “Endophytic Fungal Diversity in Coffee Leaves (*Coffea arabica*) Cultivated Using Organic and Conventional Crop Management Systems.” *Mycosphere* 5(4): 523–30.
 52. PAJARES, J., & GIL, L., 1985. *La Grafiosis de Los Olmos*, Hoja Divulgadora del M. ° de Agricultura n, ° 19/85 HD. Madrid, España.
 53. PALOMINO C., C., & GONZÁLEZ M., Y. 2014. “Técnicas Moleculares Para La Detección e Identificación de Patógenos En Alimentos: Ventajas y Limitaciones.” *Rev Peru Med Exp Salud Publica*.
 54. PELL SK. 2004. *Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae)*, PhD thesis. Louisiana State University, LA, USA.
 55. PELL, S.K., MITCHELL, J.D., LOBOVA, T., & MILLER, A.J. 2011. “Anacardiaceae,” in *The Families and Genera of Vascular Plants*, Vol. 10, ed K. Kubitzki (New York, NY: Springer-Verlag), 7–50.
 56. PÉREZ L., D.K., CASTAÑEDA P., C., & ESTRADA R., E. 2017. “A New Genus of Anacardiaceae Fossil Wood from El Bosque Formation (Eocene), Chiapas, Mexico.” *IAWA Journal* 38(4): 543–52.
 57. PÉREZ M., M., PUEYO F., M., & PÉREZ V., L. F. 2005. “Manchas de Las Hojas de Maraón (*Anacardium occidentale* L.) Provocadas Por *Phomopsis anacardii* Early & Punith.” *Fitosanidad* 9(2): 21–24.
 58. PERFECT S.E., & GREEN J.R. 2001. “Infection structures of biotrophic and

- hemibiotrophic fungal plant pathogens”. *Mol Plant Pathol.* Mar 1;2(2):101-8. doi: 10.1046/j.1364-3703.2001. 00055.x. PMID: 20572997.
59. PHOULIVONG, S. 2012. “Cross Infection of *Colletotrichum* Species; a Case Study with Tropical Fruits.” *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 2(2): 99–111.
 60. REHNER S.A. 2001. EF1 alpha primers. Available online at http://www2.clarku.edu/faculty/dhibbett/Protocols_Folder/Primers/Primers.pdf
 61. ROJAS, ENITH I. et al. 2010. “*Colletotrichum gloeosporioides* s.l. Associated with *Theobroma cacao* and Other Plants in Panamá: Multilocus Phylogenies Distinguish Host-Associated Pathogens from Asymptomatic Endophytes.” *Mycologia* 102(6): 1318–38.
 62. SANTAMARÍA, J., AND PAUL B. 2005. “Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*).” *Microbial Ecology* 50(1): 1–8.
 63. SCHOCH, C. et al. 2012. “Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(16): 6241–46.
 64. SCHULZE, N., FEUEREISEN, M., & SCHIEBER, A. 2015. “Phenolic Compounds in Edible Species of the Anacardiaceae Family - a Review.” *RSC Advances* 5(89): 73301–14. <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA11746A>.
 65. SEIFERT, K.A. 2009. “Progress towards DNA Barcoding of Fungi.” *Molecular Ecology Resources* 9(SUPPL. 1): 83–89.
 66. SERRANO, E., & GALINDO, L. 2007. “Control Biológico de Organismos Fitopatógenos: Un Reto Multidisciplinario.” *Ciencia*: 77–87.
 67. STECHER G., TAMURA K., & KUMAR S. 2020. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution* (<https://doi.org/10.1093/molbev/msz312>).
 68. STERGIOPOULOS, I., & GORDON, T. 2014. “Cryptic Fungal Infections: The Hidden Agenda of Plant Pathogens.” *Frontiers in Plant Science* 5(SEP): 1–5.
 69. SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S., & ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9:671-675.
 70. STERGIOPOULOS, I., & DE WIT, P. 2009. “Fungal Effector Proteins.” *Annual*

- Review of Phytopathology* 47(1): 233–63.
71. TESTA, M. 2019. “Plaga Acaba Con Los Árboles de Marañón.” *La Estrella de Panamá*.
72. VANHAUTE, E. 2006. “The European Subsistence Crisis of 1845-1850: A Comparative Perspective.”: 1–31.
73. VEGA, F. E. et al. 2010. “Fungal Endophyte Diversity in Coffee Plants from Colombia, Hawai’i, Mexico and Puerto Rico.” *Fungal Ecology* 3(3): 122–38.
74. VOEGELE, R.T., & MENDGEN, K. 2011. “Nutrient Uptake in Rust Fungi: How Sweet Is Parasitic Life?” *Euphytica* 179(1): 41–55.
75. WALLER, J.M., NATHANIELS, N., SIJOANA, M.E.R. & SHOMARI, S. H. 1992. “Cashew Powdery Mildew (*Oidium anacardii* Noack) in Tanzania.” *Tropical Pest Management* 38(2): 160–63.
76. WEIR, B.S., JOHNSTON, P.R., & DAMM, U. 2012. “The *Colletotrichum gloeosporioides* Species Complex.” *Studies in Mycology* 73: 115–80. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0011>.
77. WHITE T., BRUNS T., LEE S., & TAYLOR J. 1990. “Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics.” *PCR protocols: A guide to methods and applications* (January): 315.
78. WISNIEWSKI, M.E., & WILSON, C.L. 1992. “Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Recent Advances.” *HortScience* 27(2).
79. WONNI, I. et al. 2017. “Diseases of Cashew Nut Plants (*Anacardium occidentale* L.) in Burkina Faso.” *Adv Plants Agric Res.* 6(3): 78–83.
80. YANG, Y.L. et al. 2009. “*Colletotrichum* Anthracnose of Amaryllidaceae.” *Fungal Diversity* 39: 123–46.