

DETERMINACIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE
FRAILEJONES (*Espeletia Pycnophylla*: Asteraceae) DEL PÁRAMO PAJA BLANCA
MUNICIPIO DE GUALMATÁN (NARIÑO- COLOMBIA)

NATALY BENAVIDES MERA

Universidad de Nariño
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biología
Pasto, Nariño, Colombia
2019

DETERMINACIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE
FRAILEJONES (*Espeletia Pycnophylla*: Asteraceae) DEL PÁRAMO PAJA BLANCA
MUNICIPIO DE GUALMATÁN (NARIÑO- COLOMBIA)

NATALY BENAVIDES MERA

Asesoras

LUZ ESTELA LAGOS MORA

Magister en Ciencias Biológicas

CLAUDIA SALAZAR GONZALEZ

Doctora en ciencias agrarias con énfasis en protección de cultivos

Universidad de Nariño
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biología
Pasto, Nariño, Colombia
2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1ro del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Luz Estela Lagos Mora

Asesora

Claudia Salazar González

Asesora

Eddy Patricia López

Jurado

María Fernanda Mideros

Jurado

San Juan de Pasto, Nariño, Colombia

07 de Marzo 2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A mi familia por todo su amor, paciencia y colaboración. Principalmente a mi Madre Nubia Mera, Mi hermano Edward Alejandro, mi hija Melissa Alejandra y Rolando Vélez.

A la Vicerrectoría de Investigaciones, posgrados y relaciones internacionales de la Universidad de Nariño

A mis asesoras de trabajo de grado Luz Estela Lagos Mora y Claudia Salazar González por su permanente disposición y orientación durante el desarrollo de este estudio.

Al Doctor Carlos Betancourth por su tiempo en el laboratorio.

A Doctora Aida Elena Bacca por su apoyo y conocimientos en campo

A las Doctoras María Fernanda Mideros y Eddy Patricia López jurados de este trabajo de grado por su apoyo, recomendaciones y orientación.

A los Doctores Álvaro Burgos y Cesar Albornoz por su tiempo y colaboración en la granja Botana de la Universidad de Nariño.

A los laboratoristas Alirio Rodríguez, Carlos Bernal y Jhony Portillo por su apoyo en los laboratorios.

A mis compañeros, A mis amigos del grupo de investigación Genética y Evolución de organismos tropicales GENPAT y al grupo de investigación sanidad vegetal GRISAV.

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de cumplir con una mis metas.

A mi hija Melissa Alejandra Vélez Benavides y Rolando Vélez mi motivación para continuar en todo momento

A mi mamá y mi hermano que son un gran ejemplo de amor, perseverancia, fuerza, actitud positiva y quienes sin importar la situación me han apoyado en mis decisiones para alcanzar las metas propuestas.

RESUMEN

Los páramos son ecosistemas que albergan gran cantidad de especies de fauna y flora, uno de sus exponentes nativos y endémicos más importantes son los frailejones, que es una de las especies de plantas que tiene mayor éxito en el poblamiento de los ambientes y climas más extremos. Actualmente estas plantas están siendo afectadas por algún tipo de disturbio producido posiblemente por hongos causando la muerte de gran parte de los frailejones en el páramo de Paja Blanca. Para conocer el tipo de afectación que podría ser causante de esta problemática se seleccionaron plantas de la especie *Espeletia pycnophylla* del Parque Natural Regional Páramo de Paja Blanca con algún síntoma como clorosis, necrosis y entorchamiento; se realizaron aislamientos de tejidos en medio PDA y con ayuda de claves taxonómicas se identificaron cuatro géneros de hongos *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Sclerotinia* sp., *Phoma* sp. Posteriormente se realizaron pruebas de patogenicidad en frailejones del páramo Morasurco, pruebas que resultaron negativas para los cuatro géneros de hongos, esto pudo deberse a factores abióticos encontrados en el invernadero de la granja Botana de la Universidad de Nariño, debido a que cada hongo posee unas condiciones de temperatura, humedad, pH y disposición de la planta para que los hongos puedan crecer e infectarla. Por tanto, no se cumplieron los postulados de Koch para reproducción de síntomas y tampoco reaislamiento del hongo.

Palabras claves: *Espeletia pycnophylla*, *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Sclerotinia* sp., Pruebas de patogenicidad.

ABSTRACT

The Paramos are ecosystems where live a great number of species of fauna and flora. One of the most native and endemic exponents are the Frailejones. That which are one of the plant species that have the most successful in the settlement of the most extreme environments and climates. Currently these plants are being affected for some kind of disturbance possibly caused by fungus, causing the death of much of Frailejones in the Paramos. in order to know the type of affectation that could be the cause of this problematic, it were selected plants of the specie *Espeletia pycnophylla* from The Paramo Regional Natural Park of Paja Blanca with some symptoms such as: chlorosis, necrosis and entorchamiento. Tissue isolation were made in PDA medium and with the herlp of taxonomic keys, there were identificated four fungal genera, *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Sclerotinia* sp., *Phoma* sp. subsequently it were made patogenecity tests in Frailejones bring from the Morasurco Paramo, tests were negatives for the four fungal genera, this could be caused to abiotic factors founded in the greenhouse of the Botana farm of the University of Nariño, because each fungal has conditions of temperature, humidity, and plant disposition so that the fungi can grow and infect it. Therefore it were not be fulfilled the Koch postulates for the reproduction of symptoms and reisolation of the fungi

Keywords: *Espeletia pycnophylla*, *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Sclerotinia* sp., Pathogenicity tests.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	10
1. OBJETIVOS.....	14
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Ecosistema de Páramos	15
2.2. El frailejón <i>Espeletia pycnophylla</i>	15
2.3. FACTORES CAUSANTES ENFERMEDADES EN <i>Espeletia pycnophylla</i>	16
2.3.1. Factores Biótico.....	16
2.3.1.1. Hongos.....	19
2.3.1.1.1. <i>Phoma</i> sp.....	19
2.3.1.1.2. <i>Colletotrichum</i> sp.....	22
2.3.1.1.3. <i>Fusarium</i> sp.....	24
2.3.1.1.4. <i>Sclerotinia</i> sp.....	26
2.3.1.2. Otros factores bióticos.....	28
2.3.2. Factores Abiótico.....	30
2.3.3. Cambio Climático.....	31
3. ANTECEDENTES.....	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
4.1. Área de Estudio.....	34
4.2. Colecta, Purificación y Aislamiento de hongos fitopatógenos.....	35
4.3. Cultivos monospóricos.....	27
4.4. Área de crecimiento.....	28
4.5. Pruebas de patogenicidad.....	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
5.1. Colecta de material con síntomas.....	42
5.2. Caracterización de Hongos Encontrados en <i>Espeletia Pycnophylla</i> PNR Páramo de Paja Blanca.....	44
5.2.1. <i>Phoma</i> sp.....	44

5.2.2. <i>Colletotrichum</i> sp.....	46
5.2.3. <i>Fusarium</i> sp.....	48
5.2.4. <i>Sclerotinia</i> sp.....	50
5.3. Pruebas de Patogenicidad.....	51
5.3.1. Plantas inoculadas con <i>Fusarium</i> sp.....	52
5.3.2. Plantas inoculadas con <i>Colletotrichum</i> sp.....	54
5.3.3. Plantas inoculadas con <i>Sclerotinia</i> sp.	56
5.3.4. Plantas inoculadas con <i>Phoma</i> sp.....	57
CONCLUSIONES.....	63
RECOMENDACIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A. Colonia B. Picnidio de <i>Phoma</i> sp.....	21
Figura 2. A. Colonia B. Conidias cilíndricas de <i>Colletotrichum</i> sp.....	22
Figura 3. A. Colonia de <i>Fusarium</i> sp. B. Macroconidias.....	24
Figura 4. A. Colonia B. C. Esclerocios y apotecios del genero <i>Sclerotinia</i> sp.....	25
Figura 5. Ubicación del Área de estudio PNR Páramo de Paja Blanca.....	32
Figura 6. A. B. Muestras de hojas e inflorescencias de plantas C. D. Procesamiento de las muestras en el laboratorio E. F. Crecimiento de los aislamientos.....	33
Figura 7. A. Agregación de agua B. Filtrado C. Inclinação de las cajas Petri D. Observación de las conidias.....	35
Figura 8. A. B. C. Cálculo del área de crecimiento con el programa Image J.....	36
Figura 9. A. B. Colecta del material en Páramo Morasurco con papel periódico C. D. Invernadero Túquerres E. Invernadero en la Granja Botana, Universidad de Nariño.....	37
Figura 10. Inoculación de los frailejones con <i>Phoma</i> sp (A.) <i>Fusarium</i> sp. (B.) <i>Colletotrichum</i> sp. (C.) <i>Sclerotinia</i> sp. (D.).....	39
Figura 11. A. B. Plantas cubiertas con bolsas.....	40
Figura 12. Síntomas observados en los frailejones en El Parque Natural Regional Páramo de Paja Blanca (PNR Páramo de Paja Blanca).A. manchas foliares salmón y crema en la base de las hojas B.C. Manchas foliares negras D. Coloraciones anormales del ápice de las hojas E. Entorchamiento de hojas, E. Deformación de hojas, G. H. Muerte de la planta.	42
Figura 13: Cepas del género <i>Phoma</i> sp. en medio PDA. A. Anverso B. Reverso.....	43
Figura 14: Observación de estructuras a 40X de <i>Phoma</i> sp. A. Picnidio B. Ostiolo.....	44
Figura 15: Colonia de <i>Colletotrichum</i> sp. A. Anverso B. Reverso.....	45

Figura 16. Observación de estructuras a 40X de <i>Colletotrichum</i> sp. A. Clamidosporas B. Conidias.....	46
Figura 18. Observación de estructuras reproductivas a 40X de <i>Fusarium</i> sp. A y B. Macroconidias.....	48
Figura 19. Colonia de <i>Sclerotinia</i> sp. A. Anverso.....	50
Figura 20. A. B.C. Crecimiento de las hojas en los frailejones.....	51
Figura 21. A.B.C. Control D.E.F.G. Resultado para la planta No. 6: Seguimiento de plantas después de la inoculación.....	52
Figura 22. A.B. Plantas Control C.D. Plantas con síntoma de clorosis.....	53
Figura 23. A.B.C. Planta control de raíz D. E. Plantas con síntomas de clorosis en hojas y raíz roja	55
Figura 24. A. B. C. Plantas control D. E. Plantas con síntomas en el ápice de las hojas.....	57

TABLAS

TABLA 1. Georeferenciación de la toma de las muestras	32
--	----

INTRODUCCIÓN

Los páramos, son ecosistemas zonales ubicados principalmente en las montañas tropicales de Centro y Suramérica (Rangel, 2000). Este ecosistema alberga gran cantidad de especies de fauna y flora, uno de sus exponentes nativos y endémicos más importantes son los frailejones (*Espeletia* sp.) que han desarrollado características fisiológicas para adaptarse y sobrevivir a las condiciones de clima, topografía y suelos; entre las características que presentan se encuentran: una médula central que le permite almacenar agua durante la noche para sobrellevar las altas tasas de transpiración que se dan en la mañana, poseen hojas que se repliegan en la noche; confiriendo protección a heladas tanto a hojas jóvenes como a animales que habitan la roseta (insectos y arañas), contribuyen a la regulación del ciclo hídrico puesto que es uno de los factores que determina la calidad y cantidad de agua disponible para la vida, el bienestar humano y los principales ríos andinos, producen en el ecosistema grandes cantidades de biomasa que contribuye a la mitigación del cambio climático y previenen la erosión del suelo ya que preserva la cobertura vegetal (Sastoque & Gutiérrez, 2016; Díaz, Navarrete, & Suarez, 2005; García, Calderón, & Galeano, 2005; Torres J. , 2013; Cabrera & Ramírez, 2014).

Los frailejones están siendo amenazados por fitopatógenos que son microorganismos, que causan enfermedades en las plantas, por medio de disturbios en el metabolismo celular producido por la secreción de enzimas, toxinas y fitoreguladores, que absorben los nutrientes de la célula vegetal para su propio crecimiento (López B. , 2011). Entre los fitopatógenos que tienen mayor capacidad de adaptación y están ampliamente distribuidos se encuentran los hongos; estos pueden utilizar los estomas u otros órganos de comunicación natural entre la planta y el medio, también utilizan la presión mecánica o pueden penetrar el tejido vegetal por medio de aberturas naturales, pero la mayor parte de los patógenos invaden tejidos enfermos o previamente dañados (Alejo, y otros, 2013; Nakashima, y otros, 2006; Agrios, 2005; Rodríguez, 2001).

En Colombia, los estudios realizados en *Espeletia* sp. para esta problemática son puntuales y se han enfocado a una zona que es el Parque Nacional Natural Chingaza (PNN Chingaza). (Chitiva, Torrenegra, Cabrera, Díaz, & Pineda, 2002) realizaron una contribución al estudio de microhongos filamentosos en los ecosistemas páramo de Guasca y el Tablazo realizando una toma de muestra de hojas y de suelo de *Espeletia killipii* y *Espeletia barclayana* y concluyeron que

Fusarium sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. y *Epicoccum* sp. son géneros comunes en *Espeletia*.

Arias y Piñeros, (2008), realizaron el aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde, este trabajo se hizo con el fin de identificar la flora nativa de diferentes páramos Colombianos para posterior uso en investigaciones en el campo de la biotecnología. Identificaron a *Alternaria* sp. *Aspergillus* sp. *Byssosclamyces* sp. *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Emericella* sp., *Eupenicillium* sp. *Fusarium* sp. *Microsporium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Sterigmatocystis* sp. y *Trichoderma* sp. los géneros de mayor incidencia fueron *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.

Un estudio realizado por Gonzales, (2012), determinó la composición de hongos endófitos en *Espeletia argentea* (Bonpl.) en el PNN Chingaza, el aislamiento de hongos lo hizo de dos hojas procedentes de plantas sanas y dos hojas de plantas enfermas; los síntomas observados en las plantas enfermas fueron entorchamiento en las hojas, herbivoría, clorosis, manchas, necrosis y pudrición foliar. Los resultados se asociaron con los síntomas a través de revisión bibliográfica de la siguiente manera: **Clorosis** *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*., *Fusarium oxysporum*., *Nigrospora* sp. **Manchas Foliares** *Alternaria* sp. *Cladosporium* sp. **Necrosis Foliar** *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Nigrospora* sp. **Marchitez** *Fusarium oxysporum*., *Acremonium* sp. **Pudrición foliar** *Botrytis* sp.

Buitrago, Vanegas & Ramos (2015) diagnosticaron pérdida de pubescencia foliar (PPF) tanto en el haz como en el envés de las hojas, presencia de manchas necróticas, quemazón, clorosis y deformación, evaluó la incidencia de 27 individuos como el porcentaje de hojas que presentaron los síntomas mencionados y como un factor colateral a la PPF. Se estimó la incidencia de la herbivoría por plagas y la severidad se estimó con el porcentaje de área afectada de la hoja, calculado en cinco hojas por individuo seleccionadas al azar. Posteriormente se realizó aislamiento del hongo *Botrytis* sp como posible causante de PPF en *Espeletia paipana*, este estudio se lo realizó en hojas desprendidas, resultados que fueron negativos para la reproducción de síntomas producidos por el hongo *Botrytis* sp.

Actualmente, en el PNR Páramo de Paja Blanca se ha observado síntomas causados por hongos en la especie endémica *E. pycnophylla* que corresponden a manchas foliares en el haz y en

el envés, entorchamiento de hojas, marchitamiento de inflorescencias, necrosamiento de raíces y tallo y posterior muerte de plantas. Por lo tanto, el desarrollo de este trabajo de investigación permite identificar algunos de los hongos que posiblemente estén asociados con la enfermedad que presenta *E. pycnophylla* en el PNR Páramo de Paja Blanca.

Dada la importancia de los frailejones como especie endémica de los páramos la afectación provocada por fitopatógenos, insectos, acción antrópica y cambio climático, si se mantiene en el tiempo, podría poner en riesgo las poblaciones, reducirlas e incluso llevarlas a la extinción y sería una amenaza para la integridad ecológica de este ecosistema y del funcionamiento del mismo (Gonzales D. , 2012). De acuerdo con (García J. , 2003) si la cobertura vegetal del páramo desaparece por cualquier causa, la superficie quedaría expuesta a la acción directa del sol que proporcionaría la desecación del suelo, cambiando su estructura y permitiendo que la materia orgánica se descomponga más rápidamente. Por lo tanto, el reconocimiento del agente causal de la muerte de frailejones en el PNR de Páramo de Paja Blanca es muy importante ya que puede llevar a generar estrategias de manejo y/o control de la enfermedad además de conservar el funcionamiento del ecosistema, la flora y fauna que allí viven.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los hongos fitopatógenos asociados con los síntomas presentados en plantas de *Espeletia pycnophylla* (Asteraceae) en el Parque Natural Regional del Páramo de Paja Blanca.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar las características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados de las plantas de *E. pycnophylla* que presentan síntomas.

Comprobar a través de pruebas de patogenicidad si los aislamientos son los responsables de los síntomas encontrados en el PNR Páramo de Paja Blanca.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ECOSISTEMAS DE PÁRAMOS

Los páramos, son ecosistemas zonales ubicados principalmente en las montañas tropicales de Centro y Suramérica en los países de Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela y Costa Rica, se definen como extensas zonas que coronan las cordilleras entre el bosque andino y el límite inferior de las nieves perpetuas, está determinada como región natural por la relación entre el suelo, el clima, la biota y la influencia humana (Díaz, Navarrete, & Suarez, 2005; Rangel, 2000).

El páramo tiene grandes cambios en su precipitación fluvial; se ha establecido que estas precipitaciones oscilan entre los 700 y 1000 milímetros al año, el clima es frío y húmedo, sobre todo en los periodos nocturnos, la temperatura puede disminuir hasta los -8°C en la madrugada y alcanzar los +17°C en días soleados, estos periodos de alteraciones en la temperatura generan cambios en la humedad relativa, que le pueden permitir variar desde el 50% a más del 90% en cuestión de horas (Ospina, 2003). Este ecosistema tiene gran capacidad de retención de agua, posee bajas temperaturas con una alta humedad relativa lo que ayuda a que la descomposición de la materia orgánica del suelo sea lenta (Díaz, Navarrete, & Suarez, 2005).

Los ecosistemas de páramo poseen la mayor irradiación del mundo, lo que ha generado la flora más rica de montaña, con aproximadamente 3379 especies de plantas (Cabrera & Ramírez, 2014). El frailejón es una de las especies endémicas del páramo y es una de las plantas que se encuentra mejor adaptada a las condiciones de este ecosistema (Cabrera & Ramírez, 2014).

2.2. El Frailejón (*Espeletia pycnophylla*)

La posición taxonómica de la especie de acuerdo con (Díazgranados, 2012), es la siguiente: Reino: Plantae; División: Angiospermae; Clado: Eudicotiledóneas; Subclado: Asteridas; Orden: Asterales; Familia: Asteraceae; Subfamilia: Asteroideae; Tribu: Heliantheae; Subtribu Espeletiinae; Género: *Espeletia*; Especie: *Espeletia pycnophylla*.

Los caracteres morfológicos que permiten identificar a la especie son: posee una roseta caulescente, perenne, de hojas densamente pubescentes, obovadas, oblongas, sésiles e inflorescencias desnudas. Es uno de los taxones dentro del género que ha sido reportado para los páramos zonales del sur de la cordillera occidental en Colombia (Nudo de los Pastos) y el Ecuador, considerándose como el último evento de especiación de la subtribu Espeletiinae. (Cuatrecasas, 1986)

El frailejón es una especie de plantas que tienen gran éxito en el poblamiento de los ambientes y climas más extremos, debido a su diversidad de arquitecturas, patrones de crecimiento y estrategias reproductivas, lo que le permite configurar una gran variedad de interacciones ecológicas y formaciones vegetales (Eraso & Amarillo, 2016). Las principales características fisiológicas que le permite adaptarse y sobrevivir a las condiciones extremas del clima, topografía y suelos son: la formación de rosetas que sirven de defensa contra viento y frío, las hojas se repliegan en las noches confiriendo protección de heladas a hojas jóvenes como animales que habitan en la roseta (insectos y arañas) las hojas se encuentran cubiertas de tricomas para captar el agua de lluvia o de rocío, además de permitirle el aumento de su temperatura en 5°C, la permanencia de hojas muertas sobre los tallos, adicionalmente producen resinas para protegerse del congelamiento, su crecimiento es lento pues es de aproximadamente 5mm/año y se reporta para *E. argueniana* un crecimiento de 3.6 a 6.9 cm al año (Díaz, Navarrete, & Suarez, 2005; Cárdenas, 2016).

2.3. Factores Causantes de Enfermedades en *Espeletia pycnophylla*

Cuando en la fisiología de las plantas se comienza a presentar un decaimiento en su vigorosidad y salud, es donde frecuentemente se piensa en la posible acción foránea de algún agente, biótico o abiótico, el cual está comprometiendo y entorpeciendo el desarrollo biológico de la flora, que con suficiente duración son capaces de causar disminución o cesación de las actividades vitales (Torres J. , 2013).

2.3.1. Factores Bióticos

Tanto en el ecosistema agrícola como en el ecosistema natural, las plantas son afectadas por enfermedades que reducen su productividad, su fecundidad y su sobrevivencia (Toro, 2012). Los patógenos que afectan a las plantas se los denomina fitopatógenos y en este grupo se

encuentran las bacterias, los hongos y los nematodos; todos estos viven a expensas de las plantas sin aportarles nada a cambio, por lo que se les denomina parásitos (Almodóvar, 1996). Para traspasar las defensas de los vegetales los patógenos utilizan los estomas u otros órganos de comunicación natural entre la planta y el medio, mientras que otros utilizan presión mecánica, pero la mayor parte de los patógenos invaden tejidos enfermos o previamente dañados (Nakashima, y otros, 2006; Agrios, 2005; Sastoque & Gutiérrez, 2016).

2.3.1.1. Hongos

Dentro del grupo de agentes infecciosos fitopatógenos se encuentran los hongos como el grupo más grande, ya que pueden afectar a cualquier órgano de la planta siendo los síntomas más frecuentes marchitamiento, clorosis, necrosis y alteraciones en el crecimiento (Gonzales D. , 2012). Los hongos patógenos son capaces de utilizar diferentes enzimas que pueden destruir los componentes estructurales de los tejidos vegetales para la colonización y posterior muerte celular (Parra, 2008). Además, se pueden diseminar por viento o por vectores, lo cual ayuda a que su colonización sea muy rápida (Gonzales D. , 2012).

2.3.1.1.1. *Phoma* sp.

Este género es cosmopolita, fitopatógeno, parasito oportunista y saprofito, responsable de la enfermedad denominada “raíz rosada de la cebolla”, mancha ojival del tallo en quinua y la podredumbre negra de las crucíferas (Cadenas & Mattos, 2001; Gomez & Aguilar, 2016; Llumiquinga, 2015; MINAGRICULTURA, 2013). Los síntomas que se pueden observar inicialmente son: manchas negras, opacas y pequeñas en el ápice de las hojas y si las condiciones son óptimas cubre la totalidad del área foliar y las hojas se caen, cuando las hojas son maduras se observan dos o más manchas cloróticas en los bordes de las hojas y después de cinco días las manchas se necrosan y se puede observar un encrespamiento. En los tallos se observa la muerte del brote principal del tallo y de las ramificaciones laterales, presentándose un desarrollo anormal de la planta. La infección se puede presentar en cualquier estado de desarrollo tanto en tallos, hojas y frutos (Villegas, Giraldo, Benavides, & Gil, 2009; Silva, 2006).

Las colonias del género se caracterizan por ser aterciopeladas, correosas, húmedas, presenta tonalidades marrón a negro y tonalidades rosa, además de tener crecimiento rápido,

algunas especies presentan pigmento al medio (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015)(Figura 1).

En cuanto a la descripción microscópica los hongos que pertenecen a la Clase Coelomycetes se caracterizan porque forman conidios dentro de una cavidad rodeada denominada conidioma. Los conidiomas son de dos tipos: picnidios y acèrvulos (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015; Castaño, 2015). Esta clase incluye al orden Sphaeropsidales cuyas esporas asexuales se forman en picnidios, este orden comprende la familia Phaeropsidaceae en la cual está incluido el género *Phoma* sp. (Teleomorfo: *Didymella* sp.) que posee el conidioma denominado picnidio; los picnidios son uniloculares de forma redonda o piriforme y presentan uno o varios ostiolos (Figura 1).

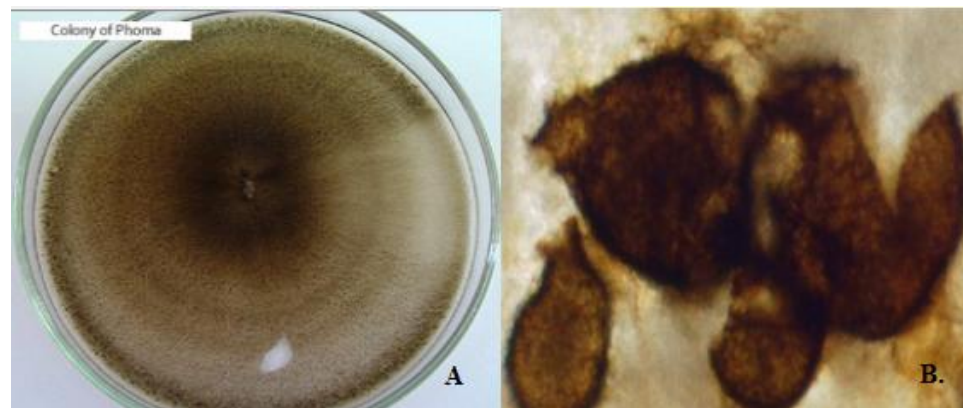


Figura 1. A. Colonia B. Picnidio de *Phoma* sp.²¹
Fuente: (Frank, 2018)

2.3.1.1.2. *Colletotrichum* sp.

El género *Colletotrichum* sp. tiene un rango de distribución cosmopolita con predominancia en Trópicos y Subtrópicos (Xiao, MacKenzie, & Legard, 2004)

. Las especies del género *Colletotrichum* sp. tienen diferentes tipos de comportamiento en el ambiente, pueden ser saprófitas hasta patogénicas, con estrecho rango de hospederos, este género se ve favorecido durante los periodos de invierno por lluvias intensas con una humedad relativa alta (Agreda, 2016; Pérez, Saquero, & Beltrán, 2003; Agrios, 2005). Entre los cultivos afectados por este género esta la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.), el tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y la cebolla (*Allium cepa*) (Calvo, 2009; Agrios, 2005). Los síntomas que se presentan inicialmente son puntos rojizos, crecimiento de lesiones en forma irregular hasta que se

unen y causan necrosis total de la hoja (Pérez, Saquero, & Beltrán, 2003). Otras características que se pueden relacionar con la enfermedad son la presencia de manchas en forma ovalada de color morado o violáceo en tallos y ramas, que pueden cubrir parte o completamente los tallos, posteriormente se tornan de coloración negra y se secan, la afectación en hojas inicia en las ramas jóvenes produciendo coloraciones negras y posteriormente marchita a las hojas que se encuentran en proceso de formación, provocándoles una coloración amarilla y posterior muerte (Tamayo, 2003; Leiva, 2011).

Las colonias de este género se caracterizan por que son algodonosas con coloración blanca, gris o hasta casi negras y en numerosos aislamientos se producen esporodoquios con setas oscuras o sin ellas, solitarios o confluentes y el color puede variar desde tonos naranja u oscuros a casi negros (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015).

Este género pertenece al phylum Ascomycota en el cual está incluida la clase Coelomicetes que a su vez tiene al orden Melanconiales que contiene a la familia Melanconiaceae que se caracteriza por producir conidios dentro de acérvulos típicamente subepidermales, esta familia contiene al género: *Glomerella* (anamorfo: *Colletotrichum*) que es el más importante, pues posee numerosas especies que producen la antracnosis (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015; Barnett & Hunter, 1987) describen conidióforos de este género como simples, alargados; conidios hialinos, unicelulares, ovoides u oblongos (Figura 2).

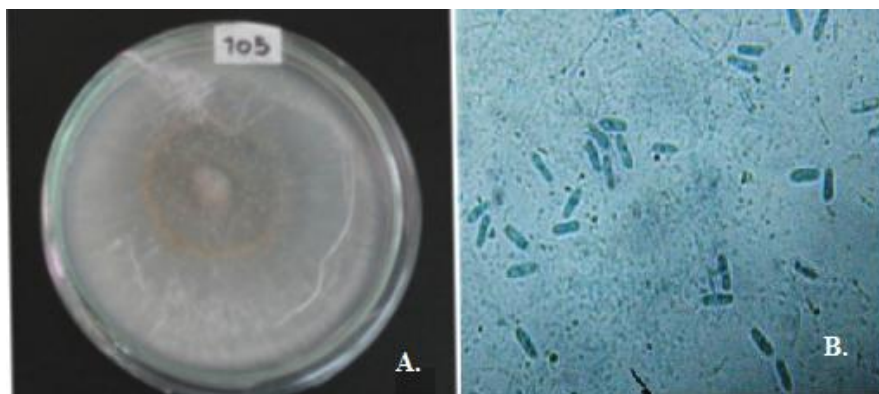


Figura 2. A. Colonia B. conidias cilíndricas de *Colletotrichum* sp.
Fuente: (Maya, 2015)

2.3.1.1.3. *Fusarium* sp.

El género es cosmopolita, sin embargo, existen excepciones para algunas especies individuales que pueden estar limitadas a una zona de suelo o de plantas (Leslie & Summerell, 2006). Este género es considerado oportunista debido a su capacidad de crecer a 37°C (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015). Las especies de este género pueden afectar a cultivos de papa denominada pudrición seca de los tubérculos (*Solanum tuberosum*) y en tomate (*Solanum betaceum*) (Pérez & Forbes, 2011; Agrios, 2005). La enfermedad se caracteriza por presentar síntomas de pudrición basal avanzada, que se distingue por la observación de micelio algodonoso de color blanco rojizo en la medula de la planta y se evidencia al realizarse cortes longitudinales encontrándose necrosis, pudrición seca y ahuecamientos acompañados de micelio en los estados avanzados de la enfermedad (Rincón, 2010)

Las características de las colonias de este género son: crecimiento rápido de textura algodonosa o aterciopelada, coloración desde blanca hasta rojo carmín y violeta, pasando por diferentes tonalidades de amarillo quemado, producen pigmentos que se observan en el reverso de las colonias o pueden ser difusibles al medio (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015). (Barnet & Hunter, 1987) describen el crecimiento de la colonia como algodonosa con micelio largo a menudo con algunos matices de rosa, morado o amarillo (Figura 3).

Para la descripción microscópica de estas colonias, (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015) las caracteriza como micelio hialino, septado y delgado. (Sañudo, Arteaga, Vallejo, Arévalo, & Burbano, 2001). El género hace parte de la clase Hyphomycetes que agrupa a los hongos en aquellos hongos miceliales que producen los conidióforos individuales, en esporodoquio o sinemas e hifas estériles, a esta clase pertenece el orden Hypocreales, que contiene a dos familias Nectriaceae y Clavicipetaceae. En la familia Nectriaceae están los géneros *Nectria* (Fr.) Fr., *Calonectria* De Not y *Gibberella* Saccardo (Anamorfo *Fusarium* sp.). Para el género *Fusarium* sp. la fiálide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas, los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados (Figuran 3). Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodoquios) y detalles de las células de los extremos (célula apical y pie) (Leslie & Summerell, 2006).

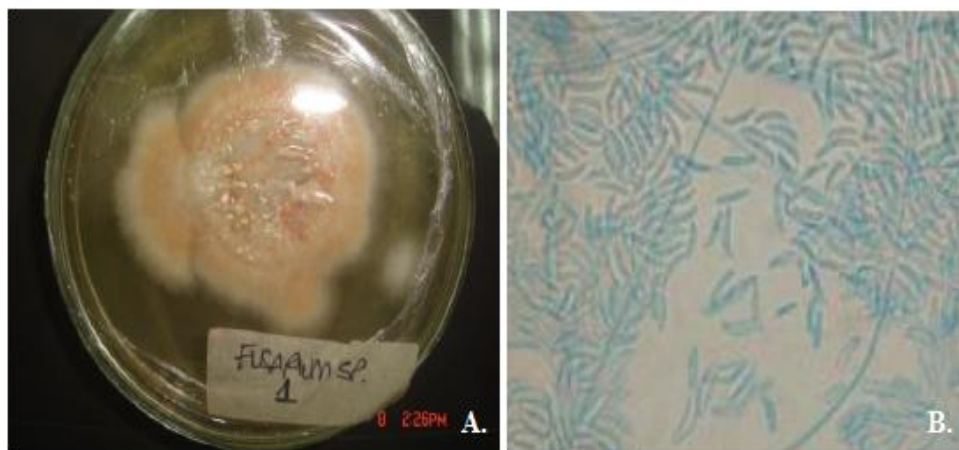


Figura 3. A. Colonia de *Fusarium* sp. B. Macroconidias
Fuente: (Duarte S. , 2007)

2.3.1.1.4. *Sclerotinia* sp.

El género *Sclerotinia* sp. es saprofita, los hongos con micelio estéril están ampliamente distribuidos y se encuentran en el suelo principalmente (Arias, Tautiva, Piedraita, & Chaves, 2017; Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015). Este género afecta a plantas particularmente a vegetales y flores como la lechuga (*Lactuca sativa*), repollo (*Brassica oleracea*) y zanahoria (*Daucus carota*) (Dilantha, Nakkeeran, & Zhang, 2004; Arias, Tautiva, Piedraita, & Chaves, 2017; Agrios, 2005). Los síntomas de esta enfermedad inician en las hojas más viejas, donde por contacto directo con las hifas se dividen dicotómicamente, formando masas de hifas y aumentan cuando las condiciones ambientales son favorables, al cabo de tres a siete días se encuentran la formación de esclerocios (Smith A. , 2007).

El género *Sclerotinia* sp. pertenece al orden Helotiales se caracteriza por no presentar estroma y cuando lo presenta es un esclerocio que es una estructura dura y resistente formada por la agregación de hifas, a este orden pertenece la familia Sclerotiniaceae en la cual el estroma es un esclerocio bien diferenciado que se forma dentro del tejido hospedero; el esclerocio germina y sobre él se desarrolla el apotecio que es de tamaño pequeño o mediano de 10 mm, generalmente estipitado o pedicelado de color marrón y glabro. Para el género *Sclerotinia* sp. es desconocido el anamorfo (Castaño, 2015; Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015; López O. , 2010). De acuerdo con (Barnet & Hunter, 1987) lo describe como cuerpos asexuales debido a la ausencia

de conidias, presenta esclerocios de color marrón a negro, globoso o irregular, compacto, micelio generalmente liviano (Figura 4).



Figura 4. A. Colonia B. Esclerocios y apotecios del género *Sclerotia* sp.
Fuente: (Mondino, 2003)

La riqueza de especies de hongos que puede albergar una planta varía de acuerdo a su condición nutricional, características ambientales y el entorno biológico (Gonzales D. , 2012). Cabe resaltar que los hongos no siempre son patógenos también existen hongos endófitos que tienen la capacidad de formar con sus hospederos relaciones simbióticas complejas, además de especificidad por tejidos que le permitirá una mejor repartición del recurso disponible, disminuyendo así la competencia entre los endosimbiontes (Gamboa, 2006). Un ejemplo de hongos no patogénicos son aquellos habitantes naturales del suelo que tienen un papel clave en los procesos de descomposición, mineralizando y reciclando los nutrientes de las plantas entre los que se encuentran los hongos saprófitos que tienen especificidad limitada por sustratos (Gonzales, 2012; Gamboa, 2006).

2.3.1.2. Otros factores bióticos

2.3.1.2.1. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares, que miden de 1-2 μm , razón por la cual no pueden verse a simple vista (Vidaver & Lambrecht, 2004). Las bacterias que se encuentran asociadas a organismos como las plantas pueden ser de dos tipos benéficas o dañinas con capacidad

de colonizar de manera sucesiva las plantas a medida que maduran (Vidaver & Lambrecht, 2004). Las bacterias en su mayoría se las encuentra como habitantes normales del suelo, esto se debe a que el suelo posee una gran variedad de condiciones y ambientes que las bacterias pueden tolerar, además dependen de la capacidad para metabolizar una fuente de carbono, presencia de agua, macro y microelementos, condiciones de pH y tamaño de las partículas (Shayne, Hugenholtz, Sangwan, Osborne, & Janssen, 2003; Hansel, 2008).

Las bacterias son organismos que son considerados fitopatógenos, capaces de causar enfermedades de mucha importancia en todo el mundo, pero en menor grado que otros fitopatógenos como los hongos o los virus, y también ocasionan relativamente menores daños y costos económicos (Shayne, Hugenholtz, Sangwan, Osborne, & Janssen, 2003; Hansel, 2008). Según (Benavides & Herminia, 2008) los microorganismos como las bacterias han sido poco estudiados en ecosistemas de páramo que son zonas poco experimentadas, este estudio se ha centrado en contribuir a la microbiología de suelos.

2.3.2.2. Insectos

Dentro de los factores bióticos las interacciones entre plantas e insectos tienen una gran atención por parte de los biólogos y agrónomos; esto debido a que los insectos herbívoros están unidos a las plantas en una estrecha relación, pues dependen de las plantas para sobrevivir y las plantas los necesitan para procesos de supervivencia, como lo es la polinización (Zavala, 2010). Sin embargo, los insectos pueden transmitir toda clase de agentes infecciosos actuando como vectores, que es la forma más importante del daño indirecto causado por insectos a las plantas; la forma como actúa el vector es de dos formas: una en donde solo es un agente eficiente de diseminación del patógeno y otra en donde es capaz de inyectar patógenos y parásitos en las plantas por la contaminación de la probóscide (Martínez G. , 2010). De acuerdo con (Medina, Varela, & Martínez, 2010) los frailejones del PNN Chingaza se encuentran afectados por insectos que son polillas del orden Lepidóptera, familia Pterophoridae, los cuales llevan el hongo responsable de la podredumbre del tallo en el frailejón.

Factores Abióticos

El páramo es un ecosistema en el cual las condiciones ambientales son drásticas y por consiguiente opera un tipo de selección abiótica (Vargas, Jaimes, Castellanos, & Mora, 2004). Un conjunto de factores climáticos, edáficos y geomorfológicos condicionan la presencia de los organismos que han logrado adaptarse a estos ambientes extremos (Vargas, Jaimes, Castellanos, & Mora, 2004). Una de estas condiciones es la temperatura, ya que las plantas experimentan un amplio rango de temperaturas en donde el calor y el frío extremos pueden matar a las plantas dañando los tejidos, desactivando enzimas y desnaturalizando las proteínas (Smith & Smith, 2010).

Actualmente se proyecta que el área de cobertura de los páramos disminuirá, ya que se encontrarán a elevaciones superiores, debidas a los aumentos de temperatura (Aranaga, 2010). Se plantea que habrá un desplazamiento o desaparición de especies como consecuencia de las nuevas condiciones ambientales que impedirán que muchas especies migren a la misma velocidad con la que el clima está cambiando afectando los servicios ambientales que ofrecen como captura de agua y regulación del ciclo hídrico (Aranaga, 2010).

El aumento en la temperatura provocará que los organismos del suelo, que habitan los ecosistemas de alta montaña se vean afectados en su comportamiento, crecimiento, reproducción, distribución horizontal y vertical, afectando las interacciones con otros organismos provocando un aumento en la frecuencia de brotes y enfermedades (Parmesan, 2003). La variación de la temperatura puede ayudar a que el patógeno se desarrolle o se mantenga en estado de latencia debido a que cada organismo posee unas condiciones de temperatura mínima, óptima o máxima (Tovar, 2011).

Otro factor abiótico es el suelo que presenta una gran diversidad de comunidades microbianas que participan en el reciclaje de nutrientes, su salud, estructura y por ende fertilidad (Tovar, 2011). Los suelos del ecosistemas de páramo presentan condiciones críticas para factores físico-químicos como son la humedad, temperatura, contenido de materia orgánica, metales pesados, fosforo y pH, las uniones simbióticas entre plantas y hongos tienen como función importante el reciclaje de nutrientes (Coba, 2005). El pH de los suelos también puede determinar la disponibilidad del Fe, Mn, Zn y Cu como reserva de la plantas (Torri, Urricariet, & Lavado, 2010).

(García J. , 2003) hace un análisis del potencial de emisión de dióxido de carbono del Páramo de Chingaza. Los suelos paramunos están constituidos en alrededor de un 10% de carbono y más del 70% del suelo es agua. El 17% del carbono orgánico total del suelo corresponde a fracciones lábiles (materia orgánica activa que representa la descomposición de residuos vegetales) que serían fuente neta de emisiones de CO₂. Los suelos de páramo son responsables de almacenar gran cantidad de materia orgánica que si la vegetación llegara a desaparecer; la materia orgánica se oxidaría y se liberaría grandes cantidades de CO₂ a la atmosfera (García J. , 2003).

Según (Díaz, Navarrete, & Suarez, 2005) entre los factores abióticos que más presión ejercen sobre los páramos está la acción antrópica pues el 8% de las áreas con uso agropecuario en el país están en los páramos que corresponden aproximadamente al 20% del área total de estos ecosistemas, con la presencia de cultivos que modifican el equilibrio natural de ellos, la quema de la vegetación de páramo hace que la materia muerta desaparezca y surjan nuevos brotes; esta vegetación fresca es atractiva para el ganado y el pastoreo y causa la compactación del suelo. Por otro lado, la quema acelera el proceso de descomposición y genera suelos más secos incrementando los niveles de temperaturas máximas.

(Mahecha, 2011) expone que los microorganismos pueden ser susceptibles a los cambios medioambientales y físicos que puedan ocurrir en los suelos, suministrando condiciones que benefician o perjudican metabólicamente y adaptativamente a algunos microorganismos como son la presencia de agua y nutrientes disponibles.

2.3.3. Cambio Climático

(Uribe, 2015) realizó un estudio acerca de cambio climático y sus efectos en la biodiversidad en América Latina. Según el autor el cambio climático ocasionará aumentos paulatinos en la temperatura de la superficie terrestre que podría estar entre 2,6 y 4,8°C, América Latina y el Caribe es una región particularmente vulnerable a las amenazas del cambio climático por la riqueza en biodiversidad y por los endemismos que alberga. Los beneficios de una alta diversidad biológica es el de asegurar un funcionamiento adecuado de procesos ecológicos así como del ecosistema (Körner & Spehn, 2004).

Algunos efectos del cambio climático son el ascenso de los páramos, desaparición de las zonas de superpáramos, el desplazamiento del páramo medio, y de la frontera agrícola, llevando a

la reducción y desaparición de muchas especies (Morales, y otros, 2007). Además, el ecosistema de páramo es uno de los más sensibles al cambio climático y a la alteración en el uso de suelo; pues trae como consecuencia las modificaciones fisiológicas en las especies y en sus ciclos de vida; aumentando la posibilidad de las plantas de ser atacadas por organismos patógenos (Fuentes, Salinas, & Hernández, 2013).

3. ANTECEDENTES

Los estudios realizados en hongos fitopatógenos en el género *Espeletia* sp. se han enfocado a una zona que es el Parque Nacional Natural Chingaza (PNN Chingaza):

(Chitiva, Torrenegra, Cabrera, Díaz, & Pineda, 2002) realizaron una contribución al estudio de microhongos filamentosos en los ecosistemas páramo de Guasca y el Tablazo, la metodología que utilizaron fue la toma de muestras de suelo y hojas de las plantas *Espeletia barclayana* y *Espeletia killipii*. y definieron por representatividad y revisión bibliográfica que *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y algunos mucorales, especialmente *Mortierella* sp. son típicas del ecosistema de páramo.

(García, Díaz, & Castañeda, 2005) Realizaron un diagnóstico preliminar de microorganismos fitopatógenos asociados a plántulas de *Espeletia grandiflora* Humb. & Bonpl propagadas para su conservación *Ex situ*. Este estudio se realizó con el objetivo de identificar los agentes fitopatógenos causantes de la muerte de plántulas de *E. grandiflora* durante las etapas de pre-emergencia y post-emergencia, a partir de muestras de tejido foliar y tallo con síntomas visuales de afectación y de la rizósfera en semilleros. Para determinar la presencia de hongos fitopatógenos, se utilizaron los métodos de cámara húmeda y siembra de tejido en placas de Petri con medio de cultivo PDA y se obtuvo como resultado la identificación del hongo perteneciente al género *Fusarium* sp. asociado a algunos de los síntomas característicos observados en plántulas.

(Medina & Varela, 2009) identificaron en la cuenca alta de la quebrada Calostros, en PNN Chingaza la presencia de hongos e insectos en las poblaciones de frailejones por lo que están aumentando de manera importante la mortalidad de estos, De acuerdo con el informe los frailejones del PNN Chingaza se encuentran afectados por insectos que son polillas del orden Lepidóptera, familia Pterophoridae, los cuales según Varela (2009) llevan el hongo responsable de la podredumbre del tallo en el frailejón.

El estudio realizado por (Gonzales D. , 2012) determinó la composición de hongos endófitos en *Espeletia argentea* (Bonpl.) en la cuenca de la quebrada Calostros (PNN Chingaza) se analizó frailejones sanos como enfermos, los resultados más importantes asociados a los síntomas a través de revisión bibliográfica fueron: clorosis debida a: *Fusarium* sp., y *Nigrospora* sp., manchas foliares por: *Alternaria* sp., y *Cladosporium* sp., necrosis foliar producida por: *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. y *Nigrospora* sp., marchitez por *Fusarium oxysporum* y *Acremonium* sp. y pudrición foliar debida a *Botrytis* sp. Los hongos endófitos identificados fueron *Wallemia* sp y *Alternaria* sp.

(Fuentes, Salinas, & Hernández, 2013) Colectaron tres tipos de larvas de lepidópteros fitófagos en las hojas del meristemo apical de los frailejones. Los resultados obtenidos fueron tres morfotipos del orden lepidóptera, familia *Pterophoridae* y son conocidos como “polillas pluma”, *Hellinsia* y noctuidae, solo una se encuentra ampliamente distribuida y ocasiona deterioro severo sobre los frailejones, esta fue identificada como *Hellinsia* sp. (Especie no reportada) responsable de la mayor lesión al meristemo apical de las plantas, entre los perjuicios que ocasiona el insecto *Hellinsia* sp., se resalta la pérdida de tejidos, clorosis severa y deformación de las hojas y deja las plantas susceptibles a otros fitopatógenos como hongos.

(Torres J. , 2013). Evaluó el grado de afectación por entorchamiento y herbivoría en una población de *E. grandiflora* Humb. & Bonpl de la cuenca alta de la Quebrada Calostros del PNN Chingaza. Se encontró una alta afectación en los frailejones, lo que se evidenció al observar que tan solo en el 51% de la población no estuvo afectada y que la proporción de individuos afectados por herbivoría fue del $32\pm 8\%$ y del $35\pm 8\%$ con entorchamiento, la severidad en el meristemo fue muy alta sobre todo para la clase juvenil, que presentó el 100% de afectación y fue la clase con el menor número de hojas en el meristemo. La condición de amenaza podría aumentar hasta 2 veces más en condiciones de disturbio que en condiciones normales. De acuerdo a Tack y Dicke, (2013) citado en este estudio la herbivoría ayuda a romper las barreras físicas de defensa que posee la planta contra patógenos.

(Buitrago, Vanegas, & Ramos, 2015). Realizan un estudio en *Espeletia paipana* (Asterales, Asteraceae), la problemática que presenta esta especie es debida a que se ha identificado una enfermedad denominada Pérdida de pubescencia foliar (PPF), la metodología que utilizaron fue en primera instancia diagnosticar la pérdida de pubescencia foliar (PPF) tanto en el haz como en

el envés de las hojas, esta enfermedad conlleva a la presencia de manchas necróticas, quemazón, clorosis y deformación, puede ser causada por la acción patogénica de microorganismos endófitos que fueron aislados de tejido foliar de la especie *E. paipana*. Este estudio realiza pruebas de patogenicidad para saber si *Botrytis* sp. es el responsable de esta enfermedad PPF; sin embargo, los resultados son negativos para la reproducción de síntomas. Este trabajo tiene gran importancia en esta especie pues está en peligro de extinción.

Según el último informe de (Velandia, 2019) se realiza una visita a PNN Cocuy en la cual se observa que toda la médula de los frailejones estaba podrida y presentaba escarabajos que se conocen como “de ambrosía” en estado adulto junto con sus larvas y huevos”; se evidenció que estos animales cumplían con todo su ciclo de vida al interior de la planta, es decir ponían sus huevos hasta la eclosión, dejando que las larvas crecieran y, una vez adultas, abandonar la planta, al abandonar la planta esta queda expuesta a organismos altamente patogénicos y oportunistas que pueden aprovechar el tejido dañado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

La colecta de muestras se realizó en el Parque Natural Regional Páramo de Paja Blanca, Municipio de Gualmantán. Ubicado en las coordenadas 0°57'27,2" N y 77° 34'49,4"W a 3.360 msnm con una humedad relativa de 77.5% con una temperatura promedio de 11.1°C (Figura 5), el PNR Páramo de Paja Blanca hacen parte siete municipios: Iles, Ospina, Sapuyes, Gualmantán, Pupiales, Contadero y Guachucal con una extensión de 3.107 Ha (Delgado, y otros, 2010; CORPONARIÑO, 2015)

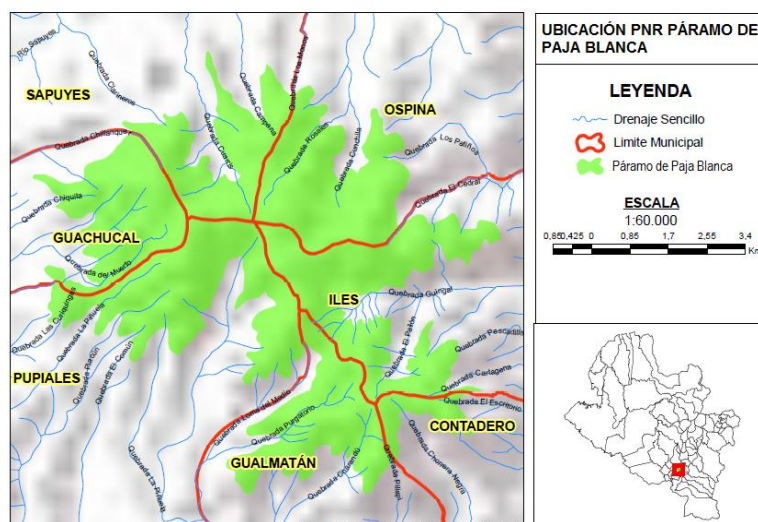


Figura 5. Ubicación del Área de estudio PNR Páramo de Paja Blanca
Fuente. Este estudio

4.2. Colecta, Purificación y Aislamiento de hongos fitopatógenos

Para la colecta de material vegetal se gestionaron los permisos correspondientes en la Universidad de Nariño y el ente de control y protección CORPONARIÑO debido a que el estudio se realizó en El Parque Natural Regional Páramo de Paja Blanca, proclamado así de acuerdo a lo establecido en el artículo 13 del decreto 2372 de 2010. Para este proceso se siguió el protocolo de (Carranza, Morales, Pedraza, Chávez, & Morales, 2015) se colectaron muestras de diferentes partes de la planta *E. pycnophylla* con sintomatología de manchas foliares en el haz y en el envés, entorchamiento de hojas, marchitamiento de inflorescencias y necrosamiento de raíces. Las muestras fueron empacadas en bolsas ziploc, almacenadas en una nevera de icopor y de cada una se georeferenció el sitio de colecta (Tabla 1).

Muestra N	Coordenadas	Temperatura	Humedad	Altitud
F1P3	0°57'27,2" N 77°34'49,4" W	24°C	37%	3.380 msnm
F1P3	0°57'27,2" N 77°34'49,4" w	24°C	37%	3.380 msnm
F3P5	0°57'27,9" N 77°34'49,9" W	24°C	38%	3.377 msnm
F1P3	0°57'27,2" N 77°34'49,4" W	24°C	37%	3.380 msnm

Tabla 1. Georeferenciación de las muestras tomadas
Fuente: Este estudio

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad de Nariño. El manejo de cada una de las partes de la planta se hizo de la siguiente manera: la toma de muestra de raíz se realizó cercana al xilema y floema, las muestras de tejido de hoja se realizaron en sitios en los cuales se observó algún síntoma y en cuanto a las inflorescencias se tomaron del raquis y pedicelo (Putnam, 1995; Torres J. , 2013).

Cada fragmento de tejido de 5mm se sumergió en tres soluciones de hipoclorito de sodio 3%, etanol 70% y agua destilada por treinta segundos en cada una, después se secaron con papel toalla para eliminar remanentes y residuos de desinfectante que pudiesen interferir con el desarrollo normal del patógeno (Molina J. , 2010) (Figura 6). Posteriormente fueron sembrados directamente en medio nutritivo Papa Dextrosa Agar (PDA) que fue preparado de acuerdo a las instrucciones estipuladas en la etiqueta del reactivo y cada caja Petri se dejó con cuatro fragmentos de tejido a temperatura ambiente y oscuridad (Agreda, 2016).



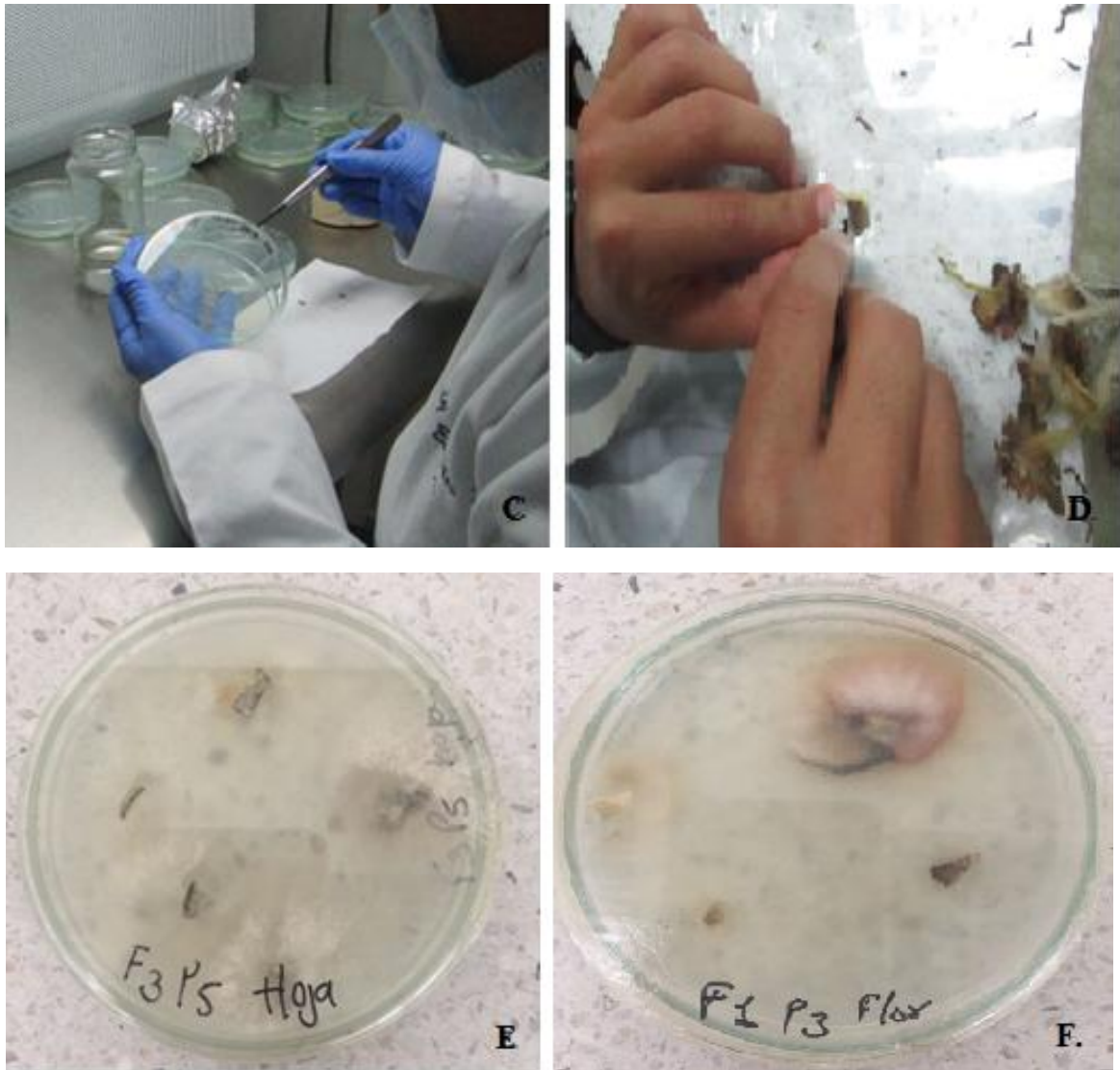


Figura 6. A. B. Muestras de hojas e inflorescencias de plantas C. D. Procesamiento de las muestras en el laboratorio E. F. Crecimiento de los aislamientos

Fuente: Este estudio

Los cultivos se observaron después de ocho días de crecimiento y se procedió a purificar los morfotipos observados. Una vez limpio el material, se realizaron las respectivas identificaciones taxonómicas de los patógenos a través de la observación al microscopio de las estructuras reproductivas en el objetivo 40X, para ello se utilizó un portaobjetos en el cual se colocó una gota de azul de lactofenol y una asa de punta con la que se tomó una muestra de tejido hifal que fue dispersada en el portaobjetos y se ubicó un cubreobjetos (Cañedo, 2004; Pérez, Saquero, & Beltrán, 2003), después de observadas las estructuras se procedió a buscar claves taxonómicas para confirmar las estructuras observadas.

(Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015) Biología de Hongos.

(Sañudo, Arteaga, Vallejo, Arévalo, & Burbano, 2001) Fundamentos de la Micología Agrícola.

(Barnet & Hunter, 1987) Illustrated genera of Imperfect Fungi.

(Hanlin, 1990) Illustrated Genera of Ascomycetes

(Leslie & Summerell, 2006) The *Fusarium* Laboratory Manual.

4.3. Cultivos monospóricos

Para realizar cultivos procedentes de una sola espora se realizó la siguiente metodología: A los cultivos iniciales puros se agregó 10 mL de agua destilada estéril, a continuación se frotó con un asa de argolla previamente esterilizada (sin tocar el medio PDA) una vez obtenida la suspensión de conidios se procedió a filtrar lo obtenido con el fin de eliminar micelio, posteriormente se tomaron tres alícuotas de 0.1 ml de dicha suspensión que se vertió en una caja Petri con medio agar PDA y con el objetivo de dispersarla se colocó de manera inclinada (Molina, Gómez, & Umaña, 2017) modificada. Se observó las conidias bajo el microscopio a diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 horas) (Figura 7). Cuando iniciaron su germinación, se tomó un asa de punta previamente esterilizada a la flama y se cortó los conidios que se encontraban germinando, posteriormente se transfirieron uno por uno a cajas Petri individuales, se vigiló continuamente el crecimiento de cada colonia obtenida (Gilchrist, y otros, 2005).

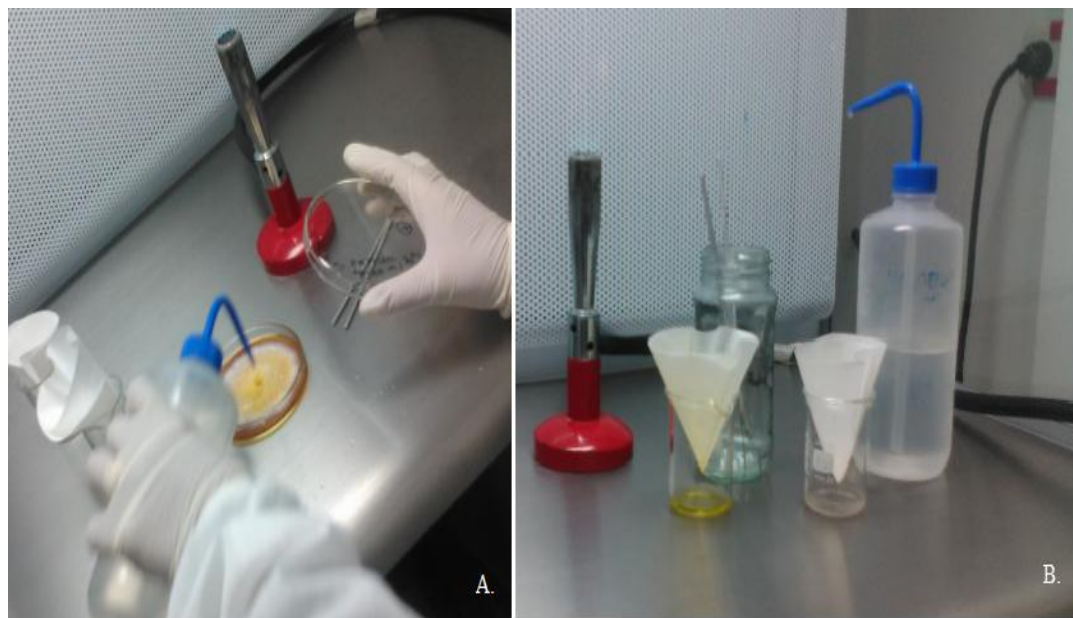




Figura 7. A. Agregación de agua B. Filtrado C. Inclínación de las cajas Petri D. Observación de las conidias.
Fuente: Este estudio

4.4. Área de crecimiento

A partir de aislamientos monospóricos de ocho días de crecimiento se adquirieron los inóculos de 5mm de diámetro y se transfirieron a medio de cultivo PDA por ocho días más, en los cuales se registró diámetro final de la colonia, utilizando un fondo negro y se colocó una regla junto a la caja, posteriormente se tomaron fotografías con cámara de 10 megapíxeles y se procesaron en el programa ImageJ 1.390 y se calculó el diámetro final de la colonia (Figura 8). Al valor del área que se obtuvo se le resto el área del inóculo (Agreda, 2016).



Figura 8. A. B. C. Cálculo del área de crecimiento con el programa Image J.
Fuente: Este estudio

4.5. Pruebas de patogenicidad

Con el fin de determinar si los microorganismos aislados a partir de tejidos afectados de *E. pycnophylla* del PNR Páramo de Paja Blanca son los causantes de la enfermedad, se dispuso de plantas sanas de *E. pycnophylla* procedentes del Páramo de Morasurco ubicado en 1°16'14,1"N - 77°14'20,6"W a 3.505 msnm posee unas condiciones de temperaturas entre los 8 y 12°C, promedio de lluvias 500 - 2000mm y humedad relativa de 82% donde no se han encontrado síntomas asociados con este disturbio (Erazo & Guerrero, 2012).

Las plantas colectadas se transportaron envueltas en papel periódico y empacadas en bolsas ziploc hasta el invernadero en la ciudad de Túquerres ubicada Latitud: 1° 05' 25" Longitud: 77° 32'24" en donde las condiciones son óptimas; ya que esta ciudad cuenta con características como temperaturas de 10.9 °C el promedio anual de lluvias es de 900 mm y una altitud de 3.104 msnm (POT, 2011). Las plantas fueron sembradas en suelo turba con pH 5.5 - 6.0. Después de tres meses de aclimatación las plantas fueron transportadas a la granja Botana de la Universidad de Nariño ubicada en las coordenadas Latitud: 1°9'29.86" Longitud: 77°16'33.85" con temperatura promedio de 13.1°C, humedad relativa de 78%, con el fin de desarrollar las pruebas de patogenicidad a las plantas se les colocó polisombra, se realizó control de insectos y babosas. (Figura 9) (IDEAM, 2018). El método utilizado para realizar las pruebas de patogenicidad, obedecen a los postulados de Koch (Duarte S. , 2007).





Figura 9. A. B. Colecta del material en Páramo Morasurco con papel periódico C. D. Invernadero Túquerres E. Invernadero en la Granja Botana, Universidad de Nariño
Fuente: Este estudio

Las plantas completaron 3 meses de adaptación a las condiciones de invernadero y suelo. Posteriormente se procedió a preparar el inóculo. El inóculo se obtuvo a partir de cultivos monospóricos de ocho días de crecimiento, se hizo un lavado micelial con agua destilada estéril, se raspó la superficie con una varilla de vidrio hasta obtener una solución homogénea, se filtró la solución para retirar micelio, posteriormente se tomó 0.1mL de esta solución resultante, y se realizó el conteo en cámara de Neubauer hasta obtener una concentración de 1×10^6 y 1×10^8 conidias/mL, sin embargo, el hongo *Sclerotinia* sp. fue inoculado con esclerocios procedentes del medio de cultivo (Smith A. , 2007).

Después de preparado el inoculo, se procedió a la inoculación de los frailejones. Para ello se seleccionaron 12 plantas por cada aislamiento, las plantas se rotularon indicando el aislamiento probado (Díaz, Medina, Latife, Digozzeli, & Sosa, 2004). La inoculación por cada tratamiento se hizo de la siguiente manera: para el género *Phoma* sp. se realizó a través de inyección de 3mL con aguja de insulina en base de las hojas ya que esta causa muerte descendente (Figura 10.A). *Colletotrichum* sp. se realizó por método de herida, realizando pequeños cortes en hoja, y por aspersión de esporas tanto a hojas jóvenes y adultas. (Figura 20.B). Para el proceso de inoculación de los frailejones con *Fusarium* sp. se efectuó mediante inyección de 3 mL en cuello de raíz (Figura 14.C). Para realizar las pruebas de patogenicidad de *Sclerotinia* sp. se efectuó mediante entierro de diez esclerocios por planta en suelo, ya que este género produce micelio estéril. Los controles se asperjaron e inyectaron con agua destilada estéril (López C. , 2013; Álvarez, Ospina, Mejía, & Llano, 2004; Robles, Gómez, Macas, Sánchez, & Torres, 2014; Smith A. , 2007).



Figura 10. Inoculación de los frailejones con *Phoma* sp (A.) *Fusarium* sp. (B.) *Colletotrichum* sp. (C.) *Sclerotinia* sp. (D.). Fuente. Este estudio

Todas las plantas inoculadas fueron cubiertas con bolsas de plástico transparente con pequeños agujeros durante 3 días y en capacidad de campo, para facilitar los procesos de desarrollo de la enfermedad (Álvarez, Armengol, Pérez, & León, 2005)(Figura 11).



Figura 11. A. B. Plantas cubiertas con bolsas
Fuente. Este estudio

A partir del momento de inoculación, todos los días las plantas fueron revisadas observando la apariencia en hojas, tallo y raíz en comparación con el testigo (Alvarez, 2013). Cuando las plantas mostraron síntomas de marchitez, manchas necróticas o clorosis, se realizó la disección de los tejidos y fueron sembrados en agar PDA para poder dar cumplimiento a los postulados de Koch (Agreda, 2016).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Material con síntomas.

Las muestras se tomaron de hojas, raíz e inflorescencia en los cuales se evidenciaron síntomas tales como manchas necróticas circulares de color marrón oscuro de un tamaño aproximado de 1 a 2 cm de diámetro en haz de las hojas, manchas de coloración toronja en la base y ápice de la hoja con un contorno irregular y un tamaño aproximado de 2 a 3 cm de diámetro, entorchamiento de hojas, inflorescencias desprendidas del meristemo de la planta, raíces desprendidas del suelo (Figura 12).





Figura 12. Síntomas observados en los frailejones en El Parque Natural Regional Páramo de Paja Blanca (PNR Páramo de Paja Blanca). A. manchas foliares salmón y crema en la base de las hojas B.C. Manchas foliares negras D. Coloraciones anormales del ápice de las hojas E. Entorchamiento de hojas, E. Deformación de hojas, G. H. Muerte de la planta. Fuente. Este estudio

5.2. Aislamiento y caracterización de hongos encontrados en *Espeletia pycnophylla* en el Parque Natural Regional Páramo de Paja Blanca.

Los resultados obtenidos de los tejidos con síntomas fueron cuatro géneros de hongos *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp. y *Sclerotinia* sp de los cuales se realizó revisión de literatura y permitió establecer que estos son causantes de enfermedad en las plantas en altitudes cercanas a donde se delimitan los páramos y en especies de la familia Asteraceae.

5.2.1. *Phoma* sp:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Coelomycetes

Orden: Sphaeropsidales

Familia: Phaeropsidaceae

Género: *Phoma*

a. Características macroscópicas

Las características macroscópicas del género *Phoma* sp en medio PDA que se obtuvieron son micelio disperso con coloración verde en el centro y marrón oscuro a su alrededor, con crecimiento máximo en ocho días de 49.0 cm² de área (Figura 13). Estas características concuerdan con las reportadas por (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015) que las caracteriza como aterciopeladas, correosas, húmedas, presenta tonalidades marrones a negro y además de tener crecimiento rápido (70 cm²), algunas especies presentan pigmento al medio.

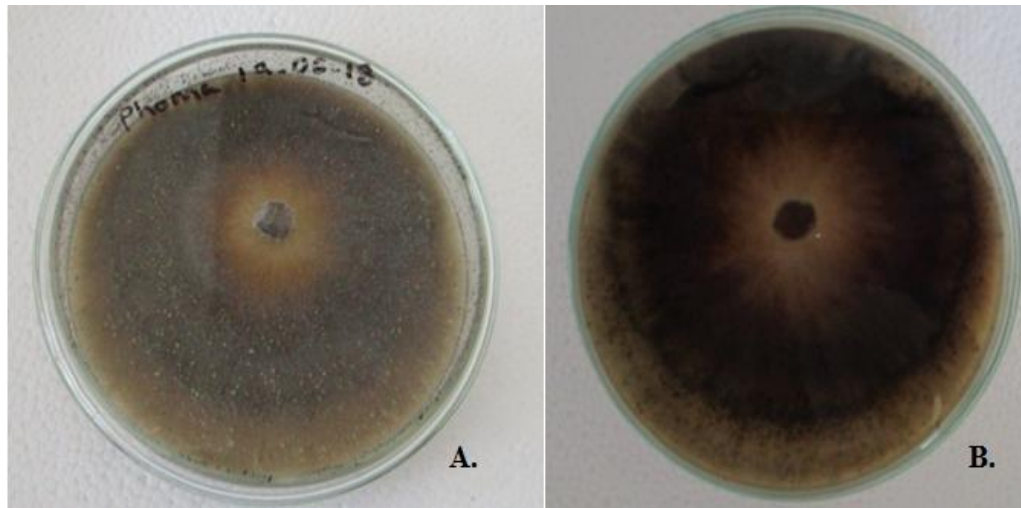


Figura 13: Cepas del género *Phoma* sp. en medio PDA. A. Anverso B. Reverso
Fuente: Este estudio

b. Características microscópicas

Presenta una estructura reproductiva conocida como picnidio de forma globosa de color café oscuro, un solo ostiolo, conidios unicelulares pequeños ovoides color marrón (Figura 14). Estas características son distintivas de la familia Sphaeropsidaceae de acuerdo con (Sañudo, Arteaga, Vallejo, Arévalo, & Burbano, 2001) que los describe como picnidios oscuros y ostiolo definido y que incluye al género *Phoma* sp. que es uno de los representantes más importantes y describe a las conidias como hialinas, unicelulares, pequeñas y globosas.

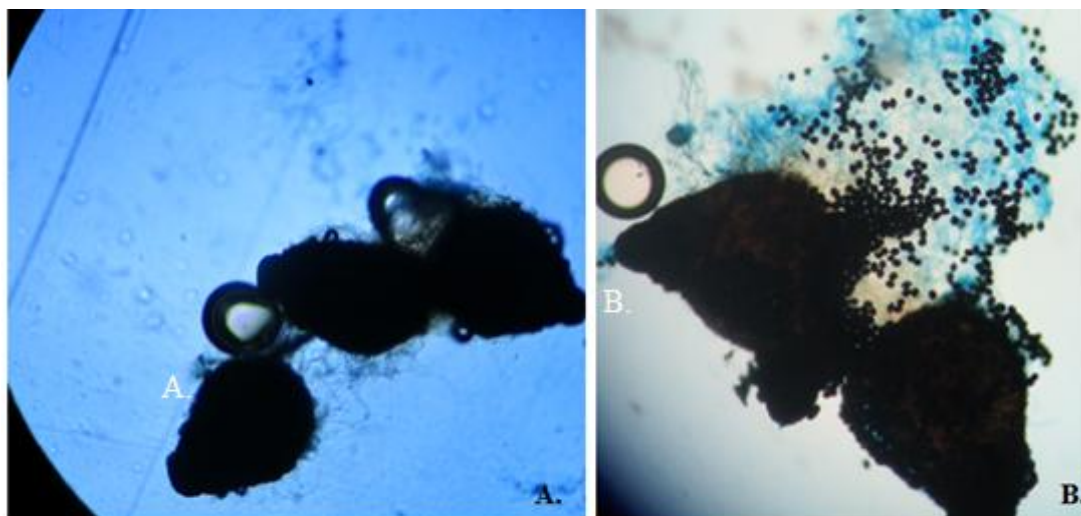


Figura 14: Observación de estructuras a 40X de *Phoma* sp. A. Picnidio B. Ostiolo.
Fuente: Este estudio

Este hongo es considerado fitopatógeno debido a que ataca las zonas de crecimiento de plantas, originando atrasos drásticos en su desarrollo, malformación de plántulas debido a la continua emisión de brotes, desarreglos de los ciclos de renovación y disminución de la producción (Menza, 2013). Un estudio realizado (Torres H. , 2002) expone diferentes enfermedades fungosas que afectan las plantas de papa, entre las que se encuentra una especie del género *Phoma* sp. a una altitud de los 2800 msnm y 3500 msnm alturas muy cercanas a los rangos donde se delimitan los páramos, el autor afirma que, si las condiciones son favorables para el hongo, la severidad puede ocasionar defoliación y ataca especialmente variedades de papa tardías. Además de acuerdo con (Aveskamp, De Gruyter, & Crous, 2008) las especies de *Phoma* sp. pueden ser invasoras secundarias de tejido vegetal debilitado o puede estar especializado en un solo género de planta o familia.

5.2.2. *Colletotrichum* sp.

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Coelomicetes

Orden: Melanconiales

Familia: Melanconiaceae

Género: *Colletotrichum*

a. Características macroscópicas

Las características macroscópicas del género *Colletotrichum* sp. que se obtuvieron son micelio de coloración blanco con masas conidiales de color salmón, el micelio es abundante y algodonoso con borde entero, la colonia cambió su coloración a una tonalidad naranja oscuro con presencia de sustancias hacia el medio, un crecimiento de 25.2 cm² de área en ocho días (Figura 15). Esta coloración salmón también la describen autores como (Maya H. , 2015; Santacruz, 2013) con el fin de apreciar diferencias entre especies y dentro de cada especie en colonias de *C. gloesporioides*.

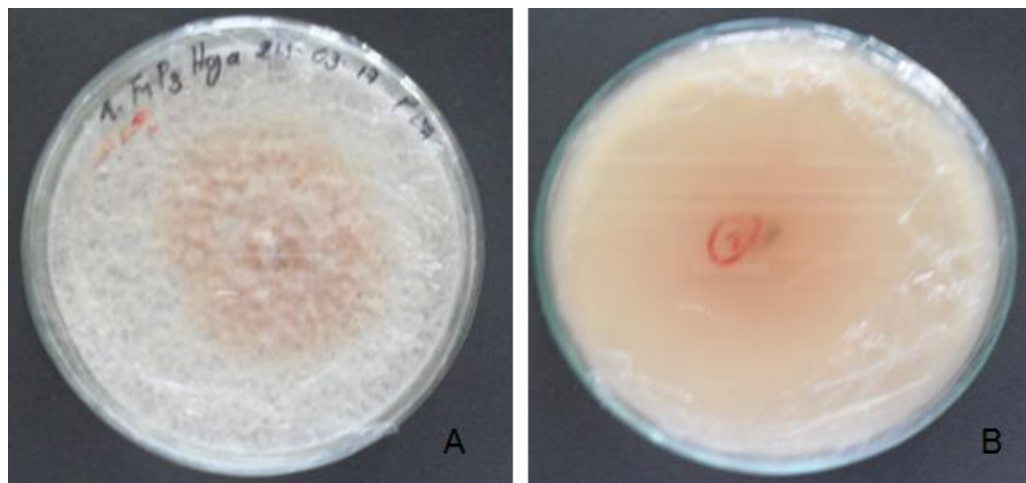


Figura 15: Colonia de *Colletotrichum* sp. A. Anverso B. Reverso

Fuente: Este estudio

b. Características microscópicas

Presencia de clamidosporas cubiertas de una capa protectora gruesa en micelio, conidios cilíndricos con extremos redondos. (Lewis, Nava, & Miller, 2004) reporta estas características microscópicas similares a *C. acutatum* incluyendo el color salmón de la esporulación y conidios cilíndricos (Figura 16).

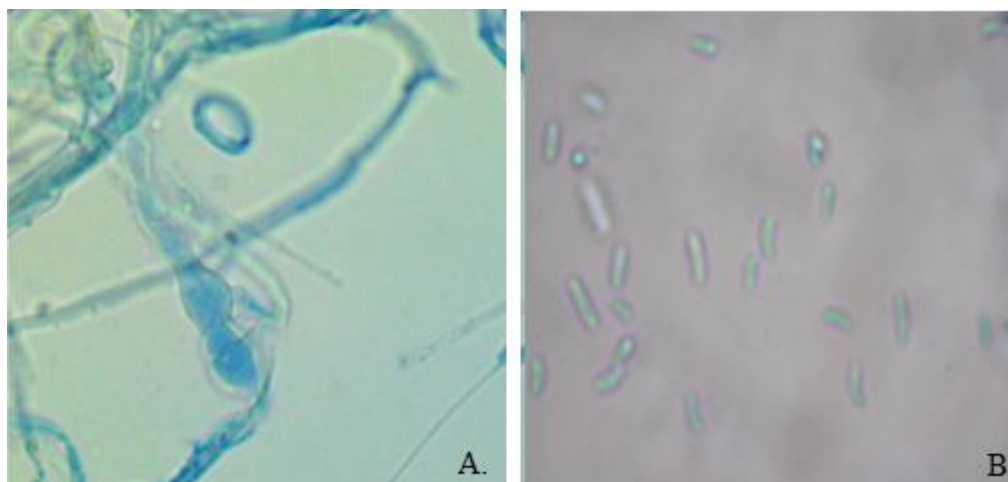


Figura 16. Observación de estructuras a 40X de *Colletotrichum* sp. A. Clamidosporas B. Conidias

Fuente: Este estudio

De acuerdo con (Cabrera & Ramírez, 2014) en el documento restauración ecológica de los páramos de Colombia: transformación y herramientas para su conservación menciona que el género *Colletotrichum* sp. es un posible hongo fitopatógeno responsable de la muerte de frailejones en el PNN Chingaza. Además, este hongo ataca a una gran variedad de plantas, ya que se encuentra distribuido a nivel mundial principalmente en cultivos de las regiones tropicales (Pérez, Saquero, & Beltrán, 2003) *Colletotrichum acutatum* ha sido reportado por (Agreda, 2016) en altitudes desde los 2200 hasta los 2900 msnm en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*).

5.2.3. *Fusarium* sp.

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Hyphomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

a. Características macroscópicas

Las características macroscópicas del género *Fusarium* sp. que se evidenciaron son micelio de coloración anaranjado en reverso y blanco en anverso sin anillos, el micelio es abundante y

algodonoso con borde lobulado, con un crecimiento máximo de 27.8 cm² de área en ocho días (Figura 17). La coloración anaranjada en el anverso la han definido (Leslie & Summerell, 2006) como uno de los colores indicadores de este género.

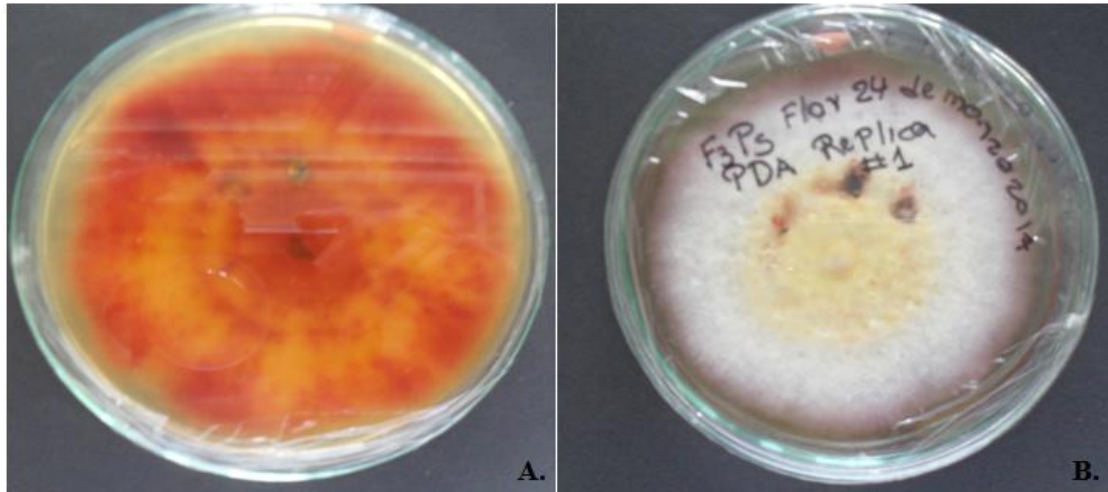


Figura 17. Cepas de *Fusarium* sp. en PDA. A. Reverso B. Anverso

Fuente: Este estudio

b. Características microscópicas

Macroconidias hialinas ligeramente curvadas de pared delgada, célula basal con terminación en punta (Figura 18). Esta descripción coincide con la expuesta por (Leslie & Summerell, 2006) que describe a un tipo de macroconidia en la que el lado dorsal (superior) es claramente más curvado que el lado ventral (inferior).



Figura 18. Observación estructuras reproductivas a 40X de *Fusarium* sp. A y B. Macroconidias.

Fuente: Este estudio

(García, Díaz, & Castañeda, 2005) Realizaron un estudio en conservación *ex situ* de frailejón *Espeletia grandiflora* Humb. & Bonpl detectaron problemas de supervivencia durante el periodo de pre y post-emergencia en condiciones bajo invernadero e hicieron una identificación de *Fusarium* sp. como uno de los posibles agentes causales de muerte de las plántulas. Este género es causante de enfermedades en la planta de mora de castilla cultivada en zonas cercanas a sitios en donde se delimitan los páramos, caracterizándose por la marchitez y pudrición de raíces (Bejarano, 2018). En un estudio realizado (Pérez & Forbes, 2011) identifican a este género como responsable de la pudrición seca de tubérculos como la papa que se arrugan momifican y luego la planta muere. Las especies reportadas por (Leslie & Summerell, 2006) afirman que estos hongos pueden crecer como endófitos aparentemente asintomáticos en muchas condiciones.

5.2.4. *Sclerotinia* sp.

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Discomycetes

Orden: Helotiales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: *Sclerotinia*

a. Características macroscópicas

El género *Sclerotinia* sp. presentó micelio estéril ya que no desarrolló apotecios en el esclerocio en medio PDA, la colonia es blanca en reverso y en el anverso, presenta un estroma que es un esclerocio de coloración negra de forma redonda, posee un crecimiento máximo de 49.1 cm² de área en ocho días y formación de esclerocios en 10 días. Para la identificación de este género se hace necesaria la formación de un apotecio; sin embargo, en este estudio no se formó la estructura como tal (Figura 19). Las características macroscópicas coinciden con las reportadas por (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015). Un estudio realizado por (Smith A. , 2007) determinó que los esclerocios podrían permitir diferenciar entre especies como en el caso de *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum* de acuerdo a su forma y tamaño.

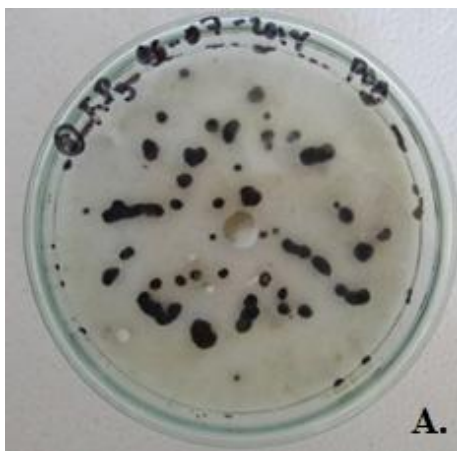


Figura 19. Colonia de *Sclerotinia* sp. A. Anverso
Fuente: Este estudio

Según (López O. , 2010; Arias, Tautiva, Piedrait, & Chaves, 2017), reportan una especie de este género que causa daños de gran importancia económica alrededor del mundo entre los cultivos más afectados por este patógeno están alfalfa, girasol, tomate, soya cacahuete, lechuga, papa, col y frijol. Afecta plantaciones como la lechuga (*Lactuca sativa*) que pertenece a la familia Asteraceae (Dilantha, Nakkeeran, & Zhang, 2004).

5.4. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Las pruebas de patogenicidad se realizaron con los hongos aislados de este trabajo que fueron *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. y *Sclerotinia* sp. considerados como posibles patógenos de los frailejones en el PNR Páramo de Paja Blanca. Los frailejones fueron colectados del Páramo Morasurco se encuentra a una altitud de 3.505 msnm, posee unas condiciones de temperaturas entre los 8 y 12°C, promedio de lluvias 500 - 2000mm y humedad relativa de 82% (Erazo & Guerrero, 2012) de este páramo fueron colectados 58 individuos que se trasplantaron a turba; según (Jordán, 2006) la turba permite mantener un mejor drenaje, pH cercano a los suelos paramunos y altos niveles de fertilidad, posteriormente fueron transportados a la ciudad de Túquerres que posee condiciones de temperatura 10.9°C, promedio anual de lluvias es de 900 mm, para iniciar el proceso de aclimatación; que de acuerdo con (Montes, Lalama, Echeverría, & Salazar, 2016) la aclimatación implica una adaptación fisiológica a los cambios que se producen en su entorno natural y que en parte están vinculados con el clima. Las plantas mantuvieron una

condición estable en su funcionamiento pudiéndose evidenciar en el crecimiento de hojas en los individuos (Figura 20) (POT, 2011). Después los frailejones fueron trasladados a la Granja Botana en las mismas condiciones con el fin de realizar las pruebas de patogenicidad.



Figura 20. A. B.C. Crecimiento de las hojas en los frailejones
Fuente. Este estudio

Las plantas se mantuvieron con polisombra de 70%, ya que su establecimiento se presenta mejor bajo el abrigo de otras plantas o de rocas, las cuales forman micrositios protegidos y húmedos, esto con el fin de evitar el sobrecalentamiento de la superficie del suelo durante el día, las temperaturas de congelamiento en la noche y los períodos de baja disponibilidad de agua (Bonilla & Gallego, 2005). El seguimiento de las plantas inoculadas se realizó todos los días, hasta el tercer mes en el cual se evidenció algún tipo de síntoma:

5.3.1. Plantas inoculadas con *Fusarium* sp.

EL resultado obtenido en este tratamiento fue la clorosis observada en el tejido foliar en la planta seis (6) debida a la falta de clorofila, esta fue comparada con la planta testigo que no presentó síntomas de este tipo (Figura 21). Estos resultados se atribuyen al síndrome MPR (Marchitez y Podredumbre de Raíz) que provoca un amarillamiento de las hojas que se relaciona con necrosis en la raíz principal y estrangulamiento a nivel del cuello (Duarte, Echevarria, & Martínez, 2016). Sin embargo, este síntoma también está relacionado con la falta de hierro, la falta de manganeso o de zinc en la planta, también resulta en clorosis, deficiencias nutricionales debidas

al pH del suelo (suelo alcalino), en donde las formas de Fe^{+3} no son aprovechables por las plantas (Juárez, Cerdán, & Sánchez, 2015). El hierro es un cofactor de enzimas que catalizan la formación de la clorofila; con un déficit de hierro, las hojas quedan con bajos niveles de clorofila afectándose el aparato productor de carbohidratos lo que repercute fuertemente en los rendimientos de las plantas (Mengel & Kirkby, 2001).

En cuanto a las condiciones de temperatura y humedad que se presentaron en el invernadero en periodo de tiempos cortos (dos horas) pudieron causar interferencia en la infección de este género a la planta ya que algunas especies de este género se ven favorecidas por temperaturas de 23°C y 28°C con una de humedad de 74 y 80% (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, & Vargas, 2015; Benaouali, y otros, 2014).



Figura 21. A.B.C. Control D.E.F.G. Resultado para la planta No. 6: Seguimiento de plantas después de la inoculación

Fuente: Este estudio

5.3.2. Plantas inoculadas con *Colletotrichum* sp.

Los resultados obtenidos en este tratamiento fueron clorosis en las márgenes de las hojas que fueron heridas para posterior dispersión del inóculo, este resultado lo describe (Croplife, 2018) el cual afirma que la fuente de inóculo del hongo (conidios) puede encontrarse en hojas cloróticas o secas, tallos y ramas afectados lo que le permitirá dispersarse, otro estudio realizado por (Martin, Cauich, Montejo, & Quijano, 2017) encontraron síntomas de clorosis en las hojas como uno de los síntomas de este género (Figura 22). Sin embargo, cuando se realizó el reaislamiento de la hoja afectada no hubo crecimiento del hongo *Colletotrichum* sp.



Figura 22. A.B. Plantas Control C.D. Plantas con síntoma de clorosis
Fuente: Este estudio

Las plantas que fueron inoculadas con *Colletotrichum* sp. fueron afectadas por las condiciones de temperatura del invernadero en gran medida esto se debió a que el desarrollo del hongo de acuerdo con (Parra, 2008) se ve favorecido por condiciones ambientales como humedad relativa del 96% con temperatura entre 10 y 30°C permitiendo ocasionar lesiones sobre hojas, ramas e inflorescencia, además también expone que el hongo depende de la precipitación y la

humedad relativa para su desarrollo, germinación y dispersión, de esta manera la esporulación no solo necesita altos niveles de humedad, sino también necesita de agua libre y con temperaturas optimas de 20 a 25° (Parra, 2008) En relación a *Colletotrichum* sp también se ha encontrado que la temperatura óptima para su desarrollo es de 20°C, con un menor desarrollo a 27°C y un escaso desarrollo a los 5°C, 10°C y 30°C, temperaturas que se vieron fuertemente influenciadas en horas desde las 12 hasta las 2 pm en donde la temperatura alcanzó hasta los 30°C (Revelo, 2014).

5.3.3. Plantas inoculadas con *Sclerotinia* sp.

Las plantas inoculadas con el hongo *Sclerotinia* sp. presentaron síntomas de clorosis en las hojas y una coloración rojiza en las raíces, sin embargo, no hubo presencia de micelio blanco en ningún órgano de la planta síntoma característico de este género de acuerdo con (Smith A. , 2007) (Figura 23). A pesar de no haberse visto síntomas de este hongo se procedió a realizar el reaislamiento resultados que fueron negativos.



Figura 23. A.B.C. Planta control de raíz D. E. Plantas síntomas de clorosis en hojas y raíz roja

Fuente: Este estudio

Las plantas inoculadas con esclerocios pertenecientes al género *Sclerotinia* sp. correspondieron también a resultados negativos, debido a que no hubo reaislamiento del hongo y tampoco hubo presencia de esclerocio o micelio (Martínez Z. , 2008) señala que la incidencia de la enfermedad no solo depende de la presencia de los esclerocios en el suelo, sino también de las condiciones ambientales, tales como la temperatura de suelo y la humedad, que afecta la producción de apotecios. Estudios realizados por (Huang & Kozub, 1991) determinan que aislamientos procedentes de regiones con clima fresco a una temperatura de 10°C podrían germinar más rápidamente que los producidos a altas temperaturas entre los 25 y 30°C para algunas de estas especies de *Sclerotinia* sp. (Arias, Tautiva, Piedrait, & Chaves, 2017) determinan que los esclerocios de una de las especies de este género se inactivan a los 35°C. Otros estudios realizados por (Matheron & Porchas, 2005) afirman que la proporción de esclerocios que germinaron en suelo húmedo tendió a decrecer a medida que la temperatura del suelo se incrementaba de 15 a 40°C,

El género *Sclerotinia* sp está también muy influenciado por el pH, ya que este factor le permite la expresión de enzimas fúngicas capaces de destruir e invadir tejidos vegetales, por lo tanto un pH entre los 4-5 favorecerá la producción de enzimas como el ácido oxálico que puede ser tóxico para las plantas permitiendo que la planta se debilite y haciéndola susceptible a la invasión, por esta razón cada organismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo muy bien definido (Benavides & Herminia, 2008).

5.3.4. Plantas inoculadas con *Phoma* sp.

Los síntomas que se pudieron evidenciar en el tratamiento inoculado con *Phoma* sp. en la planta número cinco (5) fueron coloración gris en la parte apical de las hojas síntoma que lo describe (Villegas, Giraldo, Benavides, & Gil, 2009) otro estudio realizado por (Bejarano, 2018) describe este síntoma en hojas de uchuva (Figura 24), sin embargo, al realizar el reaislamiento de los tejidos en medio PDA el resultado fue negativo para presencia de este género de hongo en las hojas con síntomas.

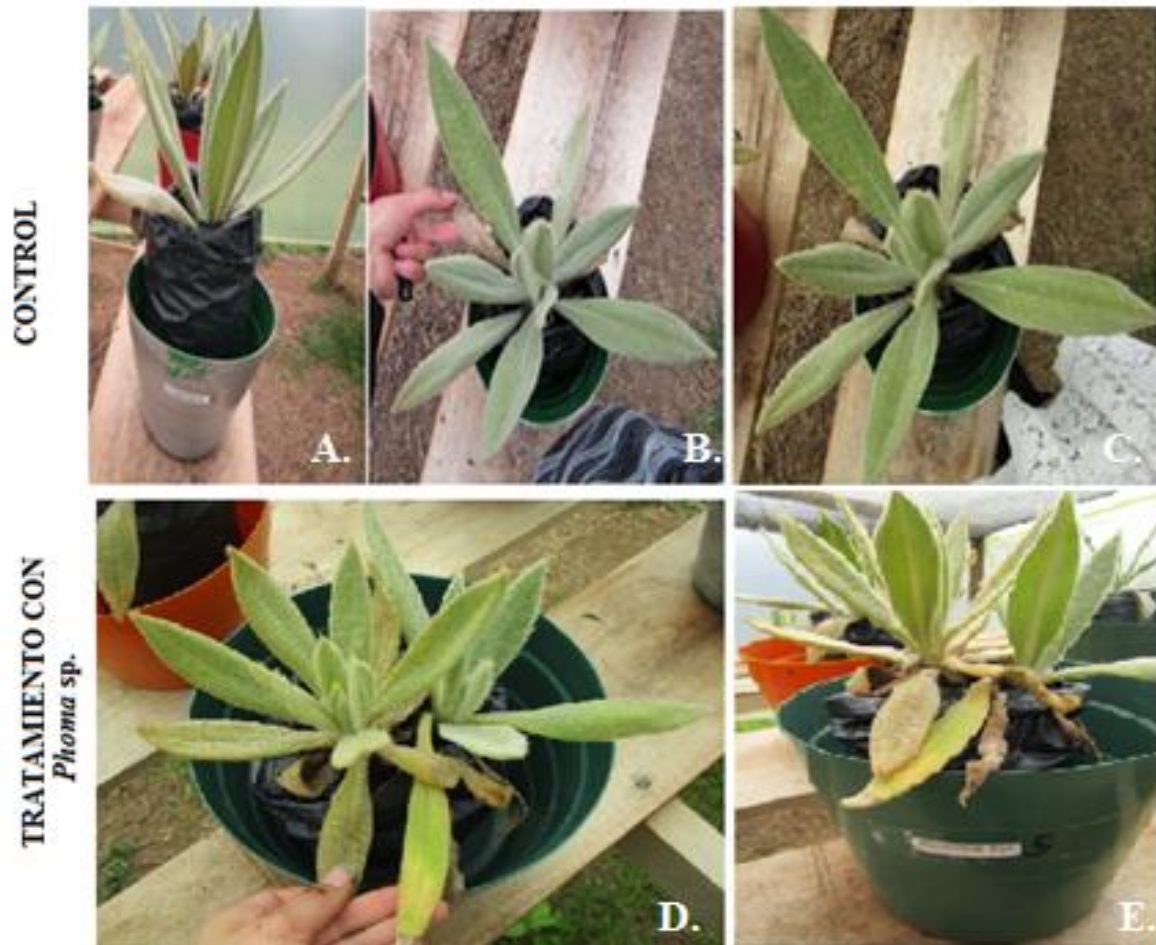


Figura 24. A. B. C. Plantas control D. E. Plantas con síntomas en el ápice de las hojas
Fuente: Este estudio

En el tratamiento inoculado con el género *Phoma* sp. no hubo reaislamiento del hongo, el estudio realizado por (Salgado, Pozza, Lima, Pereira, & Pfenning, 2003) concluyen que la reproducción de síntomas e infección de este hongo se puede dar con una mayor eficiencia en condiciones de temperatura entre los 18 y 22°C, reporta un óptimo a los 20 °C, las condiciones del invernadero de este estudio tuvo una temperatura en horas del medio día entre las 12 y 2 pm promedio de 33°C, lo que permite inferir que este hongo se vio afectado en su capacidad de infección.

Los reaislamientos de los tejidos de los cuatro tratamientos fueron negativos para la reproducción de síntomas de *Phoma* sp., *Colletotrichum* sp. *Sclerotinia* sp. y *Fusarium* sp. (Cano, 2011) afirma que las condiciones ambientales, como la temperatura, la precipitación, el pH y la

humedad relativa interfieren directamente en el proceso de desarrollo de los microorganismos en el suelo y en el crecimiento de las plantas.

Factores como la temperatura y la humedad tienen la capacidad de afectar los ciclos de vida de los patógenos, en la persistencia fuera de las plantas (en el aire, el agua, el suelo o en la superficie de las plantas) y en el proceso de infección (Coakley, Scherm, & Chakraborty, 1999).

Los resultados negativos en las pruebas de patogenicidad de este estudio complementan los estudios realizados por (Buitrago, Vanegas, & Ramos, 2015) quienes hicieron estudios en la especie *Espeletia paipana* (Asterales, Asteraceae), en el departamento de Boyacá-Colombia, en la cual evalúan la pérdida de pubescencia foliar (PPF) y sus efectos fisiológicos debidos al patógeno identificado con el género *Botrytis* sp. Los resultados más importantes que se obtuvieron es que no fue posible reproducir los síntomas de PPF en los ensayos de patogenicidad y sugiere que en condiciones naturales el agente causal de la infección podría actuar de manera sinérgica con otros microorganismos como *Nigrospora*, *Cladosporium* y *Alternaria* géneros comunes en lesiones foliares de hábito saprófito facultativo que pueden actuar de forma patogénica bajo condiciones de estrés (Fisher & Petrini, 1991; Sempere & Santamarina, 2008). Adicionalmente ponen en consideración que la participación de *Botrytis* en conjunto con otros patógenos evidencia la existencia de mecanismos de defensa de la planta frente al efecto negativo de la infección y que podría ser una de las razones por las que no se ha hecho hincapié en estudiar el estado sanitario de estas plantas y sus interacciones bióticas. Por otro lado, en el estudio demuestra que pese a la resistencia que genéticamente (por adaptación) estas especies poseen frente a la patogenicidad de muchos microorganismos, las alteraciones drásticas en las condiciones ambientales pueden promover su vulnerabilidad a todo tipo de estrés biótico (Buitrago, Vanegas, & Ramos, 2015).

Por otro lado, los hongos inoculados en este estudio tienen un proceso infeccioso que es llevado a cabo por mecanismos de señalización como los ambientales y responder con genes que favorecen su adaptación y supervivencia, sin embargo al no presentarse ningún síntoma asociado a la enfermedad en frailejones puede sugerir que el inoculo no fue lo suficientemente grande o no cayó en el sitio adecuado con las condiciones favorables para su desarrollo (Garcés, 1950; Pietro, Madrid, Caracuel, Delgado, & Roncero, 2003). Desde otro punto vista, las plantas poseen gran cantidad de “metabolitos secundarios” en cantidades variables, en tejidos vegetales adultos que le permiten defenderse contra invasiones además se encuentran permanentemente en la planta y

tienen como misión servir inicialmente como barrera y evitar la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta o inhibir la germinación de esporas (Vivanco, Cosio, Loyola, & Flores, 2005).

CONCLUSIONES

De los cuatro géneros de hongos identificados como posibles patógenos de Frailejones (*Espeletia Pycnophylla*: Asteraceae) del Páramo Paja Blanca, con los cuales se realizaron las pruebas de patogenicidad, se determinó que las plantas presentaron algún síntoma asociado a enfermedad, sin embargo no hubo reaislamiento de los patógenos inoculados en los tejidos, por tanto no hubo cumplimiento de los postulados de Koch.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios en la biología de los hongos con diferentes factores de crecimiento como temperatura, pH y sustrato, para poder relacionarlos con los cambios que están ocurriendo en los páramos.

Hacer estudios en los componentes y la fisiología de las células del frailejón para poder saber si éstas le pueden estar confiriendo alguna resistencia frente a hongos Fitopatógenos.

Realizar pruebas de patogenicidad en invernaderos con condiciones controladas que se asemejen a las de un páramo que permitan controlar temperatura y humedad relativa.

Lavar raíces, con el objetivo de que no hallan sesgos en los resultados y poder tener resultados más confiables en las pruebas de patogenicidad.

Aumentar la frecuencia de inoculación y concentración, para poder generar resultados que permitan establecer si los hongos aislados son los responsables de las enfermedades.

Para los análisis es necesario un mayor tiempo de seguimiento ya que en este estudio solo se hizo por un periodo de tres meses tiempo que podría ser insuficiente para la observación de síntomas.

BIBLIOGRAFÍA

Agreda, A. (2016). Caracterización Fenotípica Y Genotípica De *Colletotrichum* spp. Agente Causal De La Antracnosis En Mora De Castilla (*Rubus Glaucus* Benth). Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. Programa de Biología. pp. 78

Agrios, G. (2005). Phytopathology. 1ra edición. México. Ed. Limusa.

Agrios, G. (1985). Fitopatología. 1ra edición. México. Ed. Limusa. Pp.751.

Alejo, J., Navarrete, Z., Herrera, E., Mis, M., Tun-Suarez, J. & Ruiz, E. (2013). Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: identificación genérica y evaluación de fungicidas para su control. Yucatán. México Rev. Protección Veg. vol.28 no.2.

Almodóvar, W. (1996). Enfermedades en las Plantas Organismos Patógenos, Identificación y Diagnóstico. Colegio de ciencias agrícolas. pp.4.

Álvarez, S. (2013). Caracterización Molecular y Patogénica de *Colletotrichum* sp. en Cultivos de Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav) Sendt.). Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. Colombia. pp.130.

Álvarez, E., Ospina, C., Mejía, J. & Llano, G. (2004) Caracterización Morfológica, Patogénica y Genética del agente causal de la Antracnosis (*Colletotrichum glososporoides*) en Guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Centro Internacional Agricultura Tropical. Cali Colombia. Fitopatología Colombiana/Volumen 28 numero 1. pp. 8.

Álvarez, L., Armengol, J., Pérez, A. & León, M. (2005). Detección de "*Phoma exigua*" var. "heteromorpha" en viveros de adelfa ("*Nerium oleander*" L.) en España. Bol. San. Veg. Plagas, 31: pp. 417-423.

Aranaga, G. (2010). Estrategias Para Monitorear Cambio Climático En Páramos Colombianos A Partir De Estudios En Vegetación. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias. Carrera De Biología. Bogotá, D.C. pp. 32.

Arias, E., & Piñeros, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D. C. pp. 204.

Arias, L., Tautiva, L., Piedraita, W. & Chaves B. (2017). Evaluación de tres métodos de control del Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.). Universidad de Nacional. Santa Fe de Bogotá. Colombia. Agronomía Colombiana 25(1). pp. 131-141.

Aveskamp, M., De Gruyter, J. & Crous, P. (2008). Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. Fungal Diversity 31. pp. 1-18.

Bejarano, A. (2018). Guía para la producción de frutales de clima frío moderado. pp.80. Tomado de: http://misionrural.net/publicaciones/cartilla_frutas.pdf.

Benavides, & Hermida. (2008). Aislamiento e identificación de Flora Bacteriana Nativa del Suelo de los Páramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Santa Fe de Bogotá. pp. 118.

Benaouali, H., Hamini, N., Bouras, A., Benichou, S., Kihal, M. & Henni, J. (2014). Isolation, pathogenicity test and physicochemical studies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. Adv. Environ. Biol. 8(10). Pp. 36-49.

Bonilla, M. (2005). Estrategias Adaptativas de Plantas del Páramo y del Bosque Altoandino en la Cordillera Oriental de Colombia. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Departamento de Biología. pp.192.

Buitrago, S., Vanegas, L. & Ramos, C. (2015). Pérdida de pubescencia foliar y sus efectos fisiológicos en *Espeletia paipana* (Asterales, Asteraceae), en el departamento de Boyacá-Colombia. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja. Pp. 9

Cadenas, C. & Mattos, L. (2001). Etiología de la Raíz Rosada de la Cebolla y su Control Químico. Departamento de Entomología y Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Pp. 11.

Cano, M. (2011). Interacción de Microorganismos Benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. UNA REVISIÓN. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica 14 (2). pp. 15 - 31

Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. pp. 62

Cabrera, M., & Ramírez, W. (Eds). (2014). Restauración ecológica de los páramos de Colombia. Transformación y herramientas para su conservación. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D.C. Colombia. 296 pp.

Calvo, I. (2009). Cultivo De Tomate de Árbol (*Cyphomandra betaceae*). Manejo integrado de cultivos / frutales de altura. San José, Costa Rica. pp.4

Cárdenas, M. (2016). Ecohydrology of páramos in Colombia: Vulnerability to climate change and land use. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Minas Medellín, Colombia. pp. 139.

Carranza, Y., Morales, J., Pedraza, M., Chávez, A. & Morales, K. (2015) Montelongo Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología, VIII Congreso Mundial de la Palta Facultad de Agro biología “Presidente Juárez”, U.M.S.N.H., Uruapan, Michoacán, México. pp. 5.

Castaño, J. (2015). Principios Básicos de los Hongos Fitopatógenos. Universidad de Caldas. Manizales. Colombia. pp. 358.

Cepero, M; Restrepo, S; Franco, A; Cárdenas, M. & Vargas, N. (2015). Biología de Hongos. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Departamento de ciencias Biológicas. Santa fe de Bogotá. pp. 495.

Chitiva, A., Torrenegra, R., Cabrera, C., Díaz, N. & Pineda, V. (2002) Contribución al Estudio de Microhongos Filamentosos en los Ecosistemas Páramo de Guasca y El Tablazo. Universidad Javeriana. Colciencias. Bogotá. Colombia. pp.10

Coba, C. (2005). Estrategias Adaptativas de Plantas del Páramo y del Bosque Altoandina en la Cordillera Oriental de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. 354

CORPONARIÑO, (2015). Parque Natural Regional Páramo de Paja Blanca. pp. 2.

Coakley, S., Scherm, H. & Chakraborty, S. (1999) Climate change and plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 37 pp. 399-426.

Cuatrecasas, J. (1986). Speciation and radiation of the Espeletiinae in the Andes. En F. Vuilleumier y M. Monasterio (Eds.), *High altitude tropical biogeography* (pp. 267–303). New York: Oxford University.

Delgado A., Zambrano J., Ramos M., Arteaga J., Casanova M., Narváez G., Calderón J., David., M., Pantoja Y., Corporación Autónoma Regional de Nariño CORPONARIÑO Grupo de Investigación TERRA Universidad de Nariño, Asociación GAICA. (2010). Declaratoria Del “Parque Natural Regional Páramo De Paja Blanca, Territorio Sagrado Del Pueblo De Los Pastos”, Nariño – Colombia. Empresa Editora de Nariño EDINAR. San Juan de Pasto. Nariño. Colombia. pp. 92.

Diazgranados, M. (2012). A nomenclator for the frailejones (Espeletiinae Cuatrec., Asteraceae). pp.47.

Díaz, M., Navarrete J. & Suarez, T. (2005). Páramos: Hidrosistemas Sensibles. Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia. rev.ing. No.22.

Díaz, L., Medina, L., Latife, J., Digozzeli, P. & Sosa, S. (2004). Aclimatación de plantas micro propagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. Argentina. RIA, 33 (2). pp. 115-128.

Dilantha, F., Nakkeeran, S. & Zhang, Y. (2004). Ecofriendly methods in combating *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba Canada R3T 2N2. Recent Res. Devel. Environ. Biol., 1. Recent Res. Devel. Environ. Biol., 1.

Duarte, S. (2007). Pruebas de Patogenicidad *in vitro* con Microorganismos Aislados de Palmas Afectadas por Marchitez Letal. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D. C. pp. 112.

Duarte, Y., Echevarria, A. & Martínez, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. Presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. Rev. Protección Veg. Vol. 31 No. 3. pp. 173-183

Eraso, L. & Amarillo, A. (2016). Artropofauna en necromasa de dos especies de frailejones en diferentes estados Sucesionales de Páramo Andino. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Revista Colombiana de Entomología 42 (1). pp.81-90.

Erazo, Y. & Guerrero, Y. (2012). Estado actual de los ecosistemas de páramo y selva Altoandina, Morasurco, Municipio de Pasto. Universidad de NARIÑO. San Juan de Pasto. Colombia. pp. 248.

Fisher, P. & Petrini, O. (1992). Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). New Phytologist, 120(1). pp. 137-143. Tomado de: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01066.x>.

Gómez, L. & Aguilar, E. (2016). Guía de cultivo de la quinua. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Pp.130.

Medina, M. & Varela, A. (2009). Estado de avance en la investigación de las comunidades de frailejón que están siendo afectadas por insectos plaga y hongos fitopatógenos en el PNN Chingaza. Informe IDEAM. 9 p

Fuentes, L. Salinas, C., & Hernández, L. (2013). Caracterización de los lepidópteros fitófagos asociados a la herbivoría de frailejones en la microcuenca de la quebrada Calostros del Parque Nacional Natural Chingaza. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá D. C. pp. 22.

Gamboa, M. (2006). Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento Actual y Perspectivas. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia. pp.18.

Garcés, C. (1950). La Diseminación de los Fitopatógenos. Facultad de agronomía. Medellín. Rev. Fac. Nal. Agronomia. Vol XI. No 37. pp.18.

García, A., Díaz, A. & Castañeda. S. (2005). Diagnóstico preliminar de microorganismos fitopatógenos asociados a plántulas de *Espeletia grandiflora* Humb. & Bonpl. Propagadas para su Conservación *Ex situ*. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, Colombia. pp. 5.

García, N., Calderón, E., & Galeano G. (2005). Frailejones. In: Calderón E, Galeano G, García N. (Eds). Libro Rojo de Plantas de Colombia. Bogotá D.C., Colombia. pp. 225-385.

García, J. (2003). Análisis del Potencial de Emisión de Dióxido de Carbono del Páramo de Chingaza y Lineamientos para su Conservación en el Contexto del Mecanismo de Desarrollo Limpio. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de estudios ambientales y Rurales. Bogotá D.C. pp.110.

Gilchrist, L., Fuentes, G., Mart, C., López, M., Duveiller, E., Singh, P., Henry, M & García, I. (2005). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. México, D.F.

Gonzales, L. & Aguilar, E. (2016). Guía de Cultivo de la Quinoa. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Universidad Nacional Agraria. La Molina. Lima. Peru. pp.

Gonzales, D. (2012). Estudio preliminar de la composición de hongos endófitos *Espeletia argentea* en la cuenca de la quebrada Calostros (PNN Chingaza). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. Bogotá D.C. pp. 26.

Hunter, B. & Barnett, H. (1987). Illustrated genera of imperfect fungi. California. Estados Unidos de América. Pp. 226.

Hanlin, R. (1990). Illustrated genera of ascomycetes. The American Psychopathological Society. Minnesota. USA. 257.

Hansel, C., Fendorf. S., Jardine, P. & Francis, P. (2008). Changes in Bacterial and Archaeal Community Structure and Functional Diversity along a Geochimically Variable Soil Profile. Universidad de Stanford. California. American Society for Microbiology. pp. 14

Huang, C. & Kozub, C. (1991). Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. Botanical Bulletin of Academia Sinica 32. pp. 279-286. Tomado de: <https://www.cabi.org/isc/abstract/19922326313>.

Jordán, A. (2006) Manual de Edafología. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla.

Juárez, M., Cerdán, M., & Sánchez, A. (2012). Hierro en el sistema suelo planta. Departamento de agroquímica y bioquímica. Facultad de ciencias. Universidad de Alicante. pp. Tomado de <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1845/1/hierro.pdf>/ 25-03-2018

Körner, C. (2004). Mountain biodiversity, its causes and function: an overview. A global assessment. Patheron, London. pp. 20.

Vidaver, K. & Lambrecht, P. (2004). Las Bacterias como Patógenos Vegetales. Trans. Ana María Romero. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0601-01

Leiva, L. (2011). Manejo fitosanitario del cultivo de la mora (*Rubus glaucus* benth) Medidas para la temporada invernal. ICA. Bogotá. Colombia. pp. 32

Leslie, J. & Summerell, B. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Manhattan. Ed.1. pp.387.

Lewis, M., Nava, C., & Miller, S. (2004). Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. Department of Plant Pathology,. Ohio: Ohio Agricultural Research and development.

Llumiñana, Y. (2015). Caracterización Morfológica del Hongo Fitopatógeno en el Cultivo de Zanahoria (*Daucus Carota* L.) en el Sector San Buenaventura-Cotopaxi. pp. 104.

López, B. (2011). Reducción de la Fertilización Sintética con Composta y Optimización del Riego Sobre la Pudrición del Tallo (*Fusarium* spp.) del Maíz en Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo Integral Regional. Sinaloa. pp.83.

López, O. (2010). Microorganismo que utilizan Oxalato de calcio como antagonistas potenciales a *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol. Guasave. Sinaloa. pp.87.

López, N. & Castaño, J. (2013). Etiología de La Muerte Descendente del Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.). Universidad de Caldas. Revista Agronomía. 21(1). pp.12.

Martínez, G. (2010). Insectos como vectores de enfermedades en palma de aceite. Cenipalma. Vol. 31 No. Especial, Tomo I. pp.

Martínez, Z. (2008). Algunos Aspectos Epidemiológicos del Moho Blanco de la Lechuga (*Lactuca sativa*) en dos Municipios Productores de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá. Colombia. pp.99

Matheron, M. y M. Porchas. 2005. Influence of soil temperature and moisture on eruptive germination and viability of Sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. Plant Dis. 89 (1). pp. 50-54.

Mahecha, S. (2011). Comparación De La Densidad Y Actividad Bacteriana Fijadora Libre De Nitrógeno Entre Tres Usos De Suelo (Cuenca Del Otún, Risaralda). Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Carrera Microbiología Industrial Bogotá, D. C. pp. 35.

Martin, R. Cauich, J., Montejo, E., Quijano, A. (2017). Hongos fitopatógenos asociados a enfermedades en orquídeas cultivadas en la península de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. pp.6.

Maya, H. (2015). Determinación de la Variabilidad Morfológica Y Patogénica de Aislados de *Colletotrichum Gloeosporioides* en *Dioscorea Alata*, CV. Oso Y CV. Diamante 22. pp.75

Medina, M., Varela, A., & Martínez, C., (2010). Registro de daño a los frailejones (Asteraceae: *Espeletia* spp.) por insectos y hongos patógenos en el PNN Chingaza (Colombia). Cespadesia 72 pp. 67-70.

Menza, H. (2013). Epidemiología de la muerte descendente del cafeto (*Phoma* sp) en cuatro sistemas de producción en la Estación Experimental El Tambo del departamento del Cauca. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Facultad de ciencias agropecuarias. Palmira, Colombia. pp.88

MINAGRICULTURA, (2013). Brocoli dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. Pp.17.

Morales, M., Van Der Hammen, T., Torres, A., Cadena, C., Pedraza, C., Rodríguez, N., Franco, C., Betancourth, J.C., Olaya, E., Posada, E. & Cárdenas, L. (2007). Atlas de páramos de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. pp.208

Molina, J. (2010). Aislamiento y Caracterización de Hongos Patógenos Presentes en Lulo, Tomate de Árbol y Mora de Castilla Potencialmente Patógenos para los Cultivos De Gulupa (*Pasiflora Edulis* Var. *Edulis* Sims.). Pontificia Universidad Javeriana. Santa Fe de Bogotá. Colombia. pp.86.

Nakashima, K., Tran, L., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Yamaguchi- Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. The Plant Journal, 51(4), 617-630. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17587305/> 09/12/2018

Ospina, M. (2003). El Páramo de Sumapaz un Ecosistema Estratégico para Bogotá. Sociedad Geográfica de Colombia. Academia de Ciencias Geográficas. pp. 17.

Parra, L. (2008). Relación entre las infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango (*Mangifera indica* L.) variedad hilachada. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. pp.112.

Parmesan, C., Yohe, G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. Nature 421:37–42. Tomado de <https://www.nature.com/articles/nature01286>

Pérez, L., Saquero, M. & Beltrán, J. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. V, núm. 1, julio, 2003, pp. 24-35.

Pérez, W. & Forbes, G. (2011). Guía de identificación de plagas que afectan a la papa en la zona andina. Centro Internacional de la Papa (CIP). pp.44.

Pietro, A., Madrid, P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular plant pathology* 4 pp. 315-325.

POT. (2011). Plan Básico de Ordenamiento Territorial. Municipio de Túquerres. Pp.79

Putnam, N. (1995). Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. Department of Botany and Plant Pathology. Oregon State University. Estados Unidos. Vol. 14. Ossue. 6. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(95\)00038-N](https://doi.org/10.1016/0261-2194(95)00038-N).

Rangel, J. (2000). Colombia diversidad biótica III: La región de vida paramuna de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. pp.856

Revelo, E. (2010). Caracterización genética de *Colletotrichum* spp. Agente Causal de Antracnosis en Tomate de Árbol (*Solanum betasum*) en el valle de Sibundoy, Putumayo. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. pp. 149.

Rincón, C. (2010). Reconocimiento Taxonómico Preliminar de *Fusarium Roseum* (Clasificación Pendiente) Responsable de la Pudrición Basal Del Clavel Comercial en la Sabana de Bogotá. Universidad Militar Nueva Granada Facultad de Ciencias Básicas Programa de Biología Aplicada. Bogotá, D.C. Colombia. pp.114.

Rodríguez, P. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógeno del suelo de México. Instituto de fitosanidad instituto de posgrados. Montecillos chapingo. México. Acta Zool. Mex. (n.s). Número especial 1:53:78.

Robles, A., Gómez, R., Macas, F., Sánchez A. & Torres, R. (2014). Estudio de la Patogenicidad de Aislados de *Fusarium* spp., Asociados a la Marchitez Vascular del Babaco en Loja- Ecuador. Centro de Biotecnología, Vol. 3 Nro. 1. pp.12

Sañudo, B., Arteaga, M., Vallejo, W., Arévalo R., Burbano, E. (2001). Fundamentos de la micología agrícola. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. Colombia. pp. 200.

Salgado, M., Pozza E., Berger, R., Lima, L., Pereira, R. & Pfenning, L. (2003). Influencia da temperatura e do tempo de incubao no crescimento micelial e producao de conidios in vitro de

especies de phoma de cafeeiro. Trabalho apresentado no Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Resumos. Brasília

Santacruz, Cl. (2013). Caracterización Morfológica, Patogénica y Molecular de Especies de *Colletotrichum* Spp. Causantes de la Antracnosis del Fruto De Ají Y Pimentón *Capsicum* Spp. en el Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. pp.109.

Sastoque, L., & Gutiérrez, E. (2016). Espacialización del Estrés Biótico en los Frailejones Debido al Cambio Climático en el Parque Natural Chingaza Mediante UAV'S. Universidad Distrital Francisco José De Caldas. Facultad De Ingeniería Catastral Y Geodesia. Bogotá D. C. pp. 109.

Sempere, F., & Santamarina, M. P. (2008). Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Currie & Thom. International Journal of Food Microbiology, 122(1-2) pp. 35-43. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177964>.

Silva, L. (2006). Diagnóstico de la problemática actual de enfermedades en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*) en el departamento de Antioquia. Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. pp.117.

Shayne, J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C. & Janssen, P. (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Applied and environmental microbiology. Vol 69. No. 12. Pag. 7210- 7215

Smith, J. (2010). Condiciones para la vida. Capítulo 6. pp 17.

Smith, A. (2007), Caracterización, Análisis Espacial y Manejo Integrado del Moho Blanco (*Sclerotinia minor* jagger y *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en Lechuga Batavia (*Lactuca sativa* L. var. *Capitata* L.) en la Vereda la Moya (Cota - Cundinamarca). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Santa Fe Bogotá. pp. 143.

Tamayo, J. (2003). Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulo en Colombia. Boletín Técnico N° 20. Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria, CORPOICA, Regional N° 4 - Alcaldía de Medellín. pp.20

Toro, F. (2012). Evolución de métodos de control agroecológicos para la polilla del tomate *Tuta absoluta*. Universidad Internacional de Andalucía Universidad de Córdoba. Pp. 56.

Torres, H. (2002). Manual de enfermedades más importantes de la papa en el Perú. Centro Internacional de la Papa. pp. 68.

Torres, J. (2013). Evaluación Del Grado De Afectación Por Entorchamiento Y Herbivoría En Una Población De *Espeletia Grandiflora* Humb. & Bonpl. De La Cuenca Alta De La Quebrada Calostros Del Parque Nacional Natural Chingaza. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. pp. 41.

Torri, S., Urricariet, S., Ferraris, G. & Lavado, R. (2010). Micronutrientes en agroecosistemas. Ed. Faculta de agronomía (EFA-UBA). pp. 395-423.

Tovar, C. (2011). Efecto De La Modificación De La Temperatura Del Suelo Sobre La Densidad Y Riqueza De Grupos Funcionales De Nematodos En Bosque Altoandino (Cuenca Río Blanco, Cundinamarca). Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias. Carrera De Microbiología Industrial. Bogotá, D. C. pp. 29.

Uribe, J. (2015). Análisis del Potencial de Emisión de Dióxido de Carbono del Páramo Chingaza y Lineamientos Para su conservación En el contexto del mecanismo de desarrollo limpio. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. pp.110.

Vargas, O., Jaimes, V., Castellanos, L., & Mora, J. (2004). Propuesta de Actividades de Investigación para Los Páramos De Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. pp.85.

Velandia, O. (2018). Extraño daño en frailejones colombianos preocupa a investigadores. Instituto Alexander Von Humboldt. (2018). Tomado de: <http://www.humboldt.org.co/es/boletines-y-comunicados/item/1180-frailejones-en-peligro.17/08/2018>.

Venegas, J. (2002). Adaptación de técnicas y métodos para la caracterización patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Honduras. pp. 70.

Villegas, Cl., Giraldo, M., Benavides, P. Gil, Z. (2009). Aprenda a diferenciar entre la muerte descendiente y la chamusquina en árbol de café. Avance técnico de CENICAFE. pp.8

Vivanco, J., Cosio, E., Loyola, V. & Flores, H. (2005) Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia. Pp. Tomado de: https://issuu.com/sacro76/docs/mecanismos_qu__micos_de_defensa_en_09/12/2018

Xiao, L., MacKenzie, J., & Legard, E. (2004). Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated host. Phytopathology 94. pp. 446–453.

Zavala, A. (2010). Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de insectos. Vol. 20. No 117. pp.8.