

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Colletotrichum* spp. AGENTE CAUSAL
DE ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) EN EL
VALLE DE SIBUNDOY, PUTUMAYO

ELIANA GISELA REVELO GÓMEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2014

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Colletotrichum* spp. AGENTE CAUSAL
DE ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) EN EL
VALLE DE SIBUNDOY, PUTUMAYO

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al Título de
Bióloga

ELIANA GISELA REVELO GÓMEZ

Modalidad: Proyecto de Investigación

Directores

Luz Estela Lagos Mora

Magister en Ciencias Biológicas

Oscar Burbano Figueroa

Magister en Fitopatología Molecular

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2014

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1^o del acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Edith Mariela Burbano Rosero M.Sc. Ph.D
Jurado

Elkin Alexi Noguera Urbano M. en C.
Jurado

Luz Estela Lagos Mora M. Sc.
Directora

Oscar Burbano Figueroa M. Sc.
Director

San Juan de Pasto, Febrero de 2014

DEDICATORIA

Este trabajo de Investigación lo dedico:

A mis padres por apoyarme incondicionalmente, por confiar, creer en mí, y por haberme enseñado que luchando se alcanza el éxito.

A Mario Andrés y Osquitar mis grandes amores, porque son el motivo que impulsa mi vida y la recompensa a todos mis esfuerzos.

A mi gran amigo, el Profe Oscar Burbano, por ser la persona que un día me enseñó que la investigación más que una labor científica es un gran motivo de vida, de disfrute y es la puerta que abre las mejores oportunidades para triunfar profesionalmente.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme existir en este mundo y por ser la energía que hace que siempre me encuentre rodeada de las mejores personas.

A mis padres, a mis hermanos y a mi familia, por motivarme, acompañarme y apoyarme incondicionalmente durante todos mis estudios profesionales.

A todos los profesores del Departamento de Biología, especialmente a Oscar Burbano, Milena Guerrero y Aquiles Gutiérrez por compartir conmigo todos sus conocimientos, su amistad y por haberme enseñado que la Biología mas que una carrera profesional, es un estilo de vida en el cual se disfruta y se goza investigando la naturaleza.

A mi Directora Luz Estela Lagos y su Grupo de Investigación Genética y Evolución de Organismos Tropicales, por apoyarme siempre en mis labores de investigación, por guiarme y gestionar todos los recursos para sacar adelante los proyectos. A Anita Estrada, Sandra Alvarez, Pauline Bastidas, Maria Fernanda Mideros, Carolina Obando, Derly Andrade, Verónica Rodríguez, Elizabeth Portilla y Diana Burbano, por ser las compañeras de aventuras en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos por haber compartido conmigo su invaluable amistad y conocimientos en el salón de clases, en los laboratorios, en las prácticas y en la vida diaria. A Gabriela Dorado, Claudia Sanchez, Karen Suarez, Diana Betancourth, Isabel Gómez, Marcela Concha, Monica Martínez, Sandra Narvaéz, Yurany Astorquiza, César Paz, Gustavo Montenegro, Nixon Guerrero, Carolina Guerrero, Carolina Ramirez y Mario Suarez.

A mis Jurados evaluadores Mariela Burbano y Elkin Noguera, por sus grandes aportes académicos, asesoría constante y de excelente calidad, y gran disposición de trabajo.

Al profesor Carlos Torres por su gran apoyo en la elaboración de los mapas y los análisis de distribución geográfica, y su valiosa amistad.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Colciencias y a la Universidad de Nariño por la financiación de la investigación.

A todos los laboratoristas y personal de la Universidad de Nariño, que a diario me brindaron apoyo para culminar mis estudios.

A los agricultores y Alcaldes del Valle de Sibundoy, por su colaboración y gestión durante el desarrollo de la investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. OBJETIVOS	20
4. MARCO TEÓRICO	21
4.1 <i>Solanum betaceum</i>	21
4.2 Antracnosis	22
4.2.1 Antracnosis del tomate de árbol	23
4.2.2 Síntomas	23
4.3. <i>Colletotrichum</i>	24
4.3.1. Características del género <i>Colletotrichum</i>	24

4.3.2 Clasificación Taxonómica	24
4.3.3 Estrategias de penetración de <i>Colletotrichum</i>	25
4.3.4. <i>Colletotrichum acutatum</i>	27
4.3.5 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	29
4.3.6 Caracterización molecular del Género <i>Colletotrichum</i>	31
4.3.6.1. Métodos moleculares de identificación de <i>Colletotrichum</i>	32
4.4. Gen de la Beta tubulina	35
4.4.1. Conservación de las tubulinas α y β	35
5. METODOLOGÍA	38
5.1 Área de Estudio	38
5.2. Multiplicación de los aislamientos y obtención de ADN	39
5.3. Secuenciación de la región variable del gen de la β - tubulina tub2.	41
5.4. Análisis estadístico	42
5.5. Relación variabilidad genética de aislados de <i>Colletotrichum</i> , Cultivar de <i>S. betaceum</i> y su distribución geográfica	44

RESULTADOS	46
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	88

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Datos de colección de los aislados de <i>Colletotrichum</i> del Putumayo.	39
Tabla 2. Cebadores para amplificar un fragmento del gen β -tubulina	41
Tabla 3. Protocolo para PCR con primers TB5-TB6, del gen de la β -tubulina 2	41
Tabla 4. Protocolo para PCR con primers TB9-TB10, del gen de la β -tubulina 2	42
Tabla 5. Resultados del análisis del BLASTn de las secuencias del gen de la β -tubulina 2	47
Tabla 6. Clasificación y origen de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. utilizados en el estudio	49

Tabla 7.	Resumen del análisis de la varianza molecular de las poblaciones de <i>Colletotrichum acutatum</i> evaluadas mediante la secuenciación de un fragmento del gen de la β -tubulina 2	52
Tabla 8.	Polimorfismo de ADN encontrado en la población de <i>Colletotrichum acutatum</i> en el Valle de Sibundoy-Putumayo	52
Tabla 9.	Resultados de la prueba de Chi cuadrado para medir la asociación entre el tipo de cultivar de <i>Solanum betaceum</i> y el aislado de <i>Colletotrichum acutatum</i> caracterizado	53
Tabla 10.	Resultados del análisis de autocorrelación espacial I de Moran, para la población de <i>Colletotrichum acutatum</i>	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Síntomas de Antracnosis en Tomate de árbol (Fruto, Tallo y Hoja	23
Figura 2. Variabilidad morfológica de los aislados de <i>Colletotrichum acutatum</i> , indicando diferentes grupos moleculares	27
Figura 3. Morfología microscópica de <i>Colletotrichum acutatum</i>	28
Figura 4. Fotografías de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. de Putumayo con morfología 1	28
Figura 5. Fotografías de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. de Putumayo con morfología 3	28
Figura 6. Morfología macroscópica de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	30

Figura 7.	Morfología microscópica de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> A: conidias B: Setas	30
Figura 8.	Fotografías de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp de Putumayo con morfología 1	31
Figura 9.	Localización del departamento del Putumayo y municipios muestreados en el estudio	38
Figura 10.	Formato de base de datos de cultivos de tomate de árbol muestreados	45
Figura 11.	Productos de la amplificación por PCR de la región 2 del gen de la β -tubulina de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. usando los cebadores TB5 - TB6	46
Figura 12.	Productos de la amplificación por PCR de la región 2 del gen de la β -tubulina de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. usando los cebadores TB9- TB10	47
Figura 13.	Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Máxima Verosimilitud del gen β -tubulina 2 aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. provenientes de <i>Solanum</i>	50

betaceum

- Figura 14. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Máxima Verosimilitud del gen β -tubulina 2 aislados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de *Solanum betaceum* 51
- Figura 15. Gráfico simétrico entre las variables Hospedero – Patógeno mediante el Análisis Factorial de Correspondencias 53
- Figura 16. Puntos de distribución geográfica de los aislados de *Colletotrichum* spp. encontrados en *Solanum betaceum* 54
- Figura 17. Resultados de la prueba de correlación de Mantel entre la distancia genética y la distancia geográfica en la población de *Colletotrichum acutatum* del Valle de Sibundoy – Putumayo 55
- Figura 18. Mapa que refleja el agrupamiento geográfico basado en el I de Moran, según latitud de *Colletotrichum acutatum* aislado de *Solanum betaceum* en el Valle de Sibundoy 56

– Putumayo

- Figura 19. Mapa que refleja el agrupamiento geográfico basado en el I de Moran, según longitud de *Colletotrichum acutatum* aislado de *Solanum betaceum* en el Valle de Sibundoy – Putumayo 57
- Figura 20. Mapa que refleja el agrupamiento geográfico basado en el I de Moran, según altitud de *Colletotrichum acutatum* aislado de *Solanum betaceum* en el Valle de Sibundoy – Putumayo 58
- Figura 21. Mapa que refleja el agrupamiento geográfico basado en el I de Moran, según la Diversidad nucleotídica (π) de *Colletotrichum acutatum* aislado de *Solanum betaceum* en el Valle de Sibundoy – Putumayo 59

LISTA DE ANEXOS

Pág

Anexo A. Protocolo de extracción de ADN modificado de Griffith y Shaw,
1998.....79

Anexo B. Datos de la ubicación geográfica de los aislados de *Colletotrichum*
en el Valle de
Sibundoy.....80

RESUMEN

La antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) ocasionada por especies del género *Colletotrichum*, es la enfermedad que más afecta este cultivo en Colombia debido a su amplia distribución y a la magnitud de las pérdidas que genera. La alta diversidad encontrada en el amplio grupo de especies de *Colletotrichum* ha sido una problemática, ya que el diagnóstico fitopatológico requiere identificar con precisión patógenos específicos para el control de las enfermedades. En este estudio se evaluaron 50 aislados de *Colletotrichum* spp. colectados por el grupo GENPAT en los años 2008 – 2009 a partir de huertas caseras y cultivos de tomate de árbol, en las áreas rural y urbana del Valle de Sibundoy en el departamento del Putumayo. Mediante un análisis de secuencias de la región variable 2 del gen de la β -tubulina se caracterizó a los aislados del patógeno como *C. acutatum* (49) y *C. gloeosporioides* (1). El análisis filogenético realizado por el método de ML (Máxima Verosimilitud) muestra que dentro de la población de *Colletotrichum acutatum* hay 3 grupos (A1-A3).

La variabilidad genética de los aislamientos fue evaluada por medio de un análisis de varianza molecular (AMOVA) donde se evidencia una elevada variabilidad intrapoblacional (86,82%). El análisis de polimorfismos mostró que el grupo A2 es el que posee mayor diversidad genética, respecto a los grupos A3 y A1. El análisis de diversidad genética a partir de los datos

moleculares generados muestra que *C. acutatum* es un patógeno variable genéticamente, variación que podría deberse a cambios a nivel de nucleótidos en el ADN, originados por la presión de selección ejercida por la constante interacción hospedero – patógeno, mediada por la selección artificial que realizan los agricultores en el manejo del cultivo de tomate de árbol.

No se encontró correlación entre la distancia genética y geográfica de la población de *Colletotrichum acutatum*, lo cual resulta en una distribución geográfica que sigue un patrón aleatorio; por lo tanto la distribución del patógeno está directamente asociada a la disposición del cultivo de tomate de árbol que es su principal hospedero.

PALABRAS CLAVES: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Solanum betaceum*, β -tubulina.

ABSTRACT

The anthracnose caused by species of *Colletotrichum* spp, is the disease that affects the crop of tree tomato in Colombia due to its wide distribution and the magnitude of the losses generated. The high diversity found in the large group of *Colletotrichum* species has been problematic because the diagnosis requires phytopathologic accurately identify specific pathogens for disease control. In this study were collected during 2008-2009 from backyard gardens and fields in the Sibundoy Valley at the Colombian province of Putumayo. These isolates were identified as *C. acutatum* (49 isolates) and *C. gloeosporioides* (1 isolate) by β -tubulin sequencing. Phylogenetic analysis by the method of ML (Maximum Likelihood) shows that within the population of *Colletotrichum acutatum* there 3 groups (A1-A3).

Genetic variability of the isolates was assessed by an analysis of molecular variance (MANOVA) where a high variability within populations (86.82 %) is demonstrated. Polymorphism analysis showed that the A2 group is the one with greater genetic diversity, compared to the A1 and A3 groups. . Genetic diversity analysis using DNA data show that *C. acutatum* is highly diverse. This diversity can be related with the high selection pressure resulting from the changing environment of tree-tomato crop management.

There was no correlation between genetic and geographic distances of *C. acutatum* isolates. Geographical distribution of *C. acutatum* population exhibits a dominance of random pattern that can be related to host distribution.

KEYWORDS: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Solanum betaceum*, β - tubulin.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Colombia presenta un futuro promisorio en lo que respecta a la producción y comercialización del tomate de árbol (*Solanum betaceum*). Colombia y Nueva Zelanda abarcan alrededor del 65% del mercado mundial. Este cultivo participa con el 26.25% del total de exportaciones de frutas frescas tradicionales en Colombia, superado únicamente por la uvilla (DANE, 2008).

En el departamento del Putumayo el cultivo alcanzó un área cultivada de 60 hectáreas (Ha) en el año 1998. La mayor área se concentra en el Valle de Sibundoy, sólo hasta hace seis años, la plantación de tomate de árbol pasó de ser un cultivo artesanal a uno técnico y comercial. El tomate de árbol en el municipio de Santiago (Putumayo), presentó en el año 2003 un rendimiento de 13.3 (t/Ha), un ingreso anual 13.300.000 \$/Ha (millones de pesos/Ha) y una utilidad bruta de 10.247.400 \$/Ha. En los últimos años se ha notado un aumento significativo en las hectáreas sembradas del producto a nivel de todo el Valle de Sibundoy (UMATA, 2003). En el mercado local se comercializa un 5% del producto, mientras que el 95% de este frutal se vende a través de intermediarios, los cuales realizan la compra en la fincas y lo transportan hacia Nariño, Cali y otros mercados (PDM, 2012).

En Sibundoy se cultivan 60 Ha de tomate de árbol con un rendimiento de 10 (t/Ha), este cultivo se mantiene con un margen de rentabilidad aceptable. Sin embargo a causa de la incidencia de nuevas enfermedades fúngicas y virosas que lo atacan, los cultivos de tomate de árbol están siendo un foco de infección para cultivos aledaños (Centro Provincial, 2007). La comercialización de este cultivo representa uno de los sectores agrícolas más importantes en el Valle de Sibundoy y es una alternativa viable para el desarrollo de la zona. El tomate de árbol es un cultivo considerado como un frutal exótico y promisorio para varias regiones agrícolas, tanto así, que el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, lo incluyó dentro de la "Apuesta Exportadora Agropecuaria 2006-2020", como uno de los cultivos de alta potencialidad en el país (MADR, 2008).

La antracnosis en tomate de árbol (*S. betaceum*) ocasionada por especies del género *Colletotrichum*, es la enfermedad que más afecta este cultivo en Colombia debido a su amplia distribución y a la magnitud de las pérdidas que genera (Rondón *et al.*, 1999). La existencia de una amplia variabilidad de caracteres morfológicos entre los aislados de *Colletotrichum* encontrados en tomate de árbol (tamaños de las conidias, velocidad de crecimiento, color y forma de colonias), podrían indicar la existencia de tres especies: *Colletotrichum acutatum*, *C. destructivum* y *C. gloeosporioides*, aunque estudios moleculares revelan únicamente la presencia de *C. acutatum* como agente causal de la enfermedad en el tomate (Patiño *et al.*, 2007; Afanador –

Kafuri *et al.*, 2003; Portilla, 2012; Álvarez, 2013). *Colletotrichum* spp. tiene un amplio rango de hospederos presentando casos de múltiples patógenos en un sólo, así como también una sola especie del patógeno en diversos hospederos. La importancia de la diferenciación de especies es relevante en propósitos de control de la enfermedad, ya que en poblaciones mixtas de *Colletotrichum* spp. como *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, la sensibilidad de una especie a un fungicida puede ser opuesta a la de la otra causando un cambio en la estructura de la población (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003).

Para estudiar la variabilidad genética en los organismos, se requiere el uso de caracteres o marcadores genéticos que sean fáciles de identificar y de seguir en la descendencia. En la actualidad se pueden estudiar dichos organismos a nivel del ADN (Ácido Desoxirribonucleico) mediante técnicas moleculares, lo que permite la separación y caracterización genética de los diferentes individuos en donde la morfología y otros caracteres son confusos (Valverde y Paredes, 1996). Técnicas como la secuenciación de fracciones específicas del genoma, las cuales se amplifican usando PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) son muy útiles, ya que al usar cebadores que se anidan a ellas permiten diferenciar entre especies de *Colletotrichum*. Así se puede llegar a entender la identidad y la complejidad genética de una población de patógenos que afectan a un hospedero en particular; además se constituye en una herramienta esencial para formular estrategias efectivas de control (Rodríguez, 2007).

El gen de la β -tubulina que codifica para una de las familias más conservadas de las tubulinas, ha sido de gran utilidad en la reconstrucción de relaciones filogenéticas entre los hongos (Villa *et al.*, 2006). Para los análisis moleculares se utiliza esta proteína por su carácter altamente conservado (Cruz, 2003). O' Donnel *et al.*, (1998) reportaron que hay 3.5 veces más información filogenética en los genes de la β -tubulina que en los genes del rRNA (RNA ribosomal) y lo propuso como un marcador muy útil para estudiar relaciones cercanas en el género *Fusarium*.

No existen estudios previos que hayan identificado la especie y la variabilidad genética del patógeno causante de la antracnosis en el Valle de Sibundoy. Es necesaria la caracterización de poblaciones de *Colletotrichum* patógeno de los cultivos de *S. betaceum* provenientes de los municipios de Santiago, Colón, San Francisco y Sibundoy Putumayo. Lo cual permitirá posteriormente evaluar las posibles causas de la variabilidad interespecífica, y constituirse en una base para la realización de estudios sobre la variabilidad intraespecífica de las mismas. Además, los datos de estructura poblacional pueden usarse para dirigir futuras investigaciones tendientes a desarrollar estrategias de control de la enfermedad.

Con base en la información presentada, se ha formulado la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe variación genética entre los aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos a partir de cultivos de *Solanum betaceum* del Valle de Sibundoy?

2. JUSTIFICACIÓN

El tomate de árbol, *Solanum betaceum*, es uno de los cultivos promisorios para Colombia. En Colombia 19 departamentos se dedican al cultivo de 7000 Ha (MADR, 2008). En el Putumayo el área cultivada se extiende hasta 60 Ha, principalmente en el Valle de Sibundoy, aunque actualmente esta área está disminuyendo debido a problemas fitosanitarios ocasionados por patógenos causantes de gota y antracnosis (UMATA 2003, MADR, 2006, Centro Provincial, 2007), la comercialización del cultivo representa una actividad económica muy importante en esta región. La antracnosis en el cultivo de tomate de árbol, es la enfermedad de mayor incidencia ocasionada por especies del género *Colletotrichum*, y ante la ausencia de cultivares resistentes a la enfermedad, ésta debe manejarse con diferentes técnicas de control (Pérez *et al.*, 2006).

La alta diversidad encontrada en el amplio grupo de especies de *Colletotrichum* ha sido una problemática, ya que el diagnóstico fitopatológico requiere identificar con precisión patógenos específicos para el control de las enfermedades. Esta confusión taxonómica ha provocado el aumento en el uso de herramientas moleculares para la identificación de diversidad interespecífica e intraespecífica dentro de los complejos de especies (Guerber *et al.*, 2003).

Según estudios realizados por GENPAT (2010) y Estrada y Lagos (2010), la mayor parte de colonias de los diferentes aislados de *Colletotrichum* spp. provenientes del Valle de Sibundoy presentaron una morfología similar entre sí, con formación de abundante micelio aéreo, algodonoso y de color blanco grisáceo, con bordes enteros, ausencia de sectores y masas de conidias de color naranja. Las observaciones realizadas sobre el color del reverso de las colonias de los aislados mostraron que, en general presentan color naranja claro y blanco grisáceo.

Los caracteres morfológicos estudiados permitieron una separación clara de los aislados en tres grupos, sin embargo dentro de ellos existe una amplia divergencia de subgrupos. De acuerdo con las características morfológicas observadas, los diferentes aislados de *Colletotrichum* se clasificarían dentro de la especie *C. acutatum* y un grupo pequeño presenta una morfología afín a *C. gloeosporioides*. Estos resultados ponen de manifiesto el problema de identificar la especie de *Colletotrichum* basándose exclusivamente en características morfológicas o culturales, por eso es necesario utilizar otras técnicas, como caracteres biológicos (sensibilidad a fungicidas, hidrólisis de la caseína, etc.), ecológicos, evaluación de tasas de crecimiento, análisis de isoenzimas o técnicas moleculares para realizar una correcta identificación (Bonde *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 1992; Bailey *et al.*, 1996).

Las técnicas de biología molecular han provisto de nuevas herramientas en la sistemática, particularmente en la delimitación de especies y en la definición de las relaciones inter e intraespecíficas. En los últimos años, el uso de dichas técnicas ha conducido a la reclasificación de varios aislados de *C. gloeosporioides* como *C. acutatum*.

Según Talhinhos *et al.*, 2002 es necesario usar diferentes marcadores moleculares como: PCR con iniciadores específicos, secuencias espaciadoras internas (ITS), secuencias de genes como la β -tubulina 2 (*tub2*) y la histona 4 (*his4*), PCR (APPCR), o análisis de AFLP, con el fin de ofrecer diferentes niveles de resolución taxonómica. El uso de genes específicos representan además de un potencial interés taxonómico, un buen marcador genómico, para diferenciar entre el nivel de especie y subespecie. Este es el más amplio multinivel aprovechado para la caracterización del patógeno causante de antracnosis y el principal uso taxonómico de estos genes dentro del género *Colletotrichum*. Talhinhos *et al.*, (2002), afirman además que el uso de secuencias del gen de *tub2* e *his4* permitieron verificar el agrupamiento filogenético obtenido con ITS, ayudando a superar la potencial limitación de las copias divergentes de ITS que existen dentro de aislados de *Colletotrichum* spp (Lanfranco *et al.*, 1999). Rodríguez (2007), reporta que el gen de la β -tubulina, posee un nivel de resolución interespecífica mayor que los ITS, en un estudio de caracterización de especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica*.

En la zona de estudio no se han identificado con precisión las especies de *Colletotrichum* causantes de la enfermedad desconociendo su biología y comportamiento epidemiológico, aspecto que condiciona directamente las estrategias de control. Este trabajo da un primer paso para responder a esa cuestión, mediante la caracterización genética de los aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de *S. betaceum* afectados por antracnosis. Hasta el momento según los estudios adelantados por el Grupo de Investigación en Evolución y Genética de organismos tropicales (2010) ha resultado en la diferenciación de dos subgrupos morfológicamente afines a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* y se descarta la presencia de *C. destructivum* ya que ninguna colonia presentó color rosado como es característico de esta especie.

Por lo tanto, la caracterización genética de *Colletotrichum* spp. obtenido de aislados de cultivos de *Solanum betaceum* en las zonas productoras del Valle de Sibundoy (Putumayo) abordado en este proyecto permitirá la identificación de la variabilidad genética de la población de *Colletotrichum* spp. que está causando antracnosis en tomate de árbol, además brindará las pautas iniciales para entender si probablemente existe una distribución geográfica específica del patógeno, lo cual daría paso a proponer futuros estudios sobre la biología y epidemiología del hongo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genéticamente las poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas al cultivo de tomate de árbol provenientes del Valle de Sibundoy.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar la variabilidad genética de los aislados de *Colletotrichum* spp. mediante el análisis de la región variable 2 del gen de la β -tubulina.

Relacionar la variabilidad de los aislados de *Colletotrichum* spp. con el cultivar de *Solanum betaceum* que hospeda y su distribución geográfica en el Valle de Sibundoy.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 *Solanum betaceum*

El centro de domesticación de *Solanum betaceum* son los Andes suramericanos (Ecuador, Perú, Chile y Bolivia), presentándose especies silvestres relacionadas en las áreas de domesticación (Ecuador y Perú) (Morton, 1999; Pickersgill, 2007). A partir de estas regiones el cultivo se ha extendido a otros lugares del mundo, Colombia es el principal productor del continente americano de tomate de árbol (MAG/IICA 2001).

Las principales limitantes identificadas para la tecnificación de este cultivo son: la deficiencia en la calidad del material de siembra, las malas prácticas para la utilización de productos agroquímicos que generalmente conducen a sobrefertilización y al empleo excesivo de insecticidas y fungicidas, el manejo inapropiado de la postcosecha, especialmente en lo relacionado con el empaque y transporte y la ausencia de adecuada asistencia técnica profesional (MADR, 2008; MAG/IICA, 2001).

El tomate de árbol es una baya aromática de forma ovoide, punteada en su extremo inferior y con un cáliz cónico, está cubierta por una cáscara gruesa, lisa, brillante y cerácea, de sabor amargo, en tonos ladrillo, rojos, naranjas y amarillos según la variedad; en el interior, los colores de la pulpa varían entre

naranja, rojo y amarillo; ésta es ligeramente firme, suave y jugosa, con un sabor agridulce; en el centro de la fruta, rodeadas de pulpa más suave que la capa exterior, se encuentran entre 200 y 400 pequeñas semillas comestibles, de forma plana y circular (MAG/IICA, 2001). En Colombia y Ecuador el cultivo del tomate de árbol se caracteriza por la gran heterogeneidad en formas y tamaños de los frutos entre y dentro de una misma plantación, consecuencia de las hibridaciones y mezcla de material genético a través del tiempo (Albornoz, 1992; Lobo, 2002). En ambos países no existen variedades comerciales, sino poblaciones locales, multiplicándose y seleccionándose por parte de los cultivadores, lo que a largo plazo puede detener una eventual expansión de las áreas cultivadas (MADR, 2008). El sabor y tamaño de la fruta difiere en su mezcla de sabor dulce y agrio según la variedad. En Colombia se distinguen tres tipos: tamarillo, morado o rojo y amarillo. Las variedades se reconocen por el color, y se escogen según la forma de consumo de la fruta. Así, el tomate rojo se prefiere para consumo en fresco por su color atractivo, mientras que el amarillo se prefiere para la elaboración de conservas por su sabor (MAG/IICA, 2001).

Según GENPAT (2011) en el Valle de Sibundoy los agricultores distinguen 4 cultivares para el tomate de árbol: común o rojo común, morado o injerto, holandés e híbrido. Estos se diferencian principalmente por las características de coloración del fruto. Tanto el cultivar injerto y el rojo común corresponden a la clasificación presentada por Bernal y Díaz (2006) en

características de la planta como el fruto; el cultivar holandés corresponde a un cultivar local cuyas características son muy similares al cultivar amarillo redondo. Entre ellas la que más se cultiva es la variedad común que equivale debido probablemente al fácil acceso a las plántulas, a su alto rendimiento en producción de fruto, a su sabor característico y a su supuesta resistencia a patógenos; además ésta variedad es la más manejada por generaciones anteriores. En un segundo lugar está la variedad híbrida debido probablemente al gran auge obtenido en los últimos años principalmente bajo comercialización directa de semillas, además de presentar un gran rendimiento total de frutos y por tener las condiciones necesarias para poder ser comercializada en el exterior.

4.2 Antracnosis

Colletotrichum es uno de los géneros de hongos Ascomicete que están implicados en las enfermedades en plantas, principalmente antracnosis, pero especialmente como la causa de los problemas pre y post-cosecha en muchos frutales propios del trópico (Bailey y Jeger, 1992). Su impacto económico ha conducido a extensos estudios en diversos aspectos de la biología tales como especificidad del hospedero, biología celular del proceso de infección, interacción hongo hospedero, diversidad genética y epidemiología. Especies de este género han sido usadas como modelo para estudiar estrategias de infección e interacciones hospedero parásito,

definiendo las bases genéticas del estilo de vida simbiótico de los hongos y del desarrollo de la infección y de los sistemas de pronóstico de las enfermedades.

Colletotrichum como agente causal de antracnosis, afecta follaje y especialmente frutos donde los síntomas son más diferenciados. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad, si no se aplican medidas de control, pueden llegar al 100%, las cuales se pueden reducir hasta en un 75% con el uso frecuente de fungicidas. El control de la enfermedad se ha enfocado casi exclusivamente hacia la utilización de productos químicos, que ocasionan alta presencia de residuos, lo cual produce desequilibrio ecológico y contaminación ambiental; situación que se acelera por el uso excesivo e indiscriminado de fungicidas como el dicarbamato, sobre todo cuando se presentan condiciones propicias para el desarrollo y multiplicación del patógeno (Pérez *et al.*, 2006).

La mayor parte de las pérdidas ocasionadas por las especies de *Colletotrichum* ocurren cuando los frutos son infectados, aunque otras zonas de la planta pueden ser infectadas, como hojas, tallos y flores. Existen dos tipos de enfermedades de *Colletotrichum* que afectan los frutos, aquella que causa enfermedad sobre frutos inmaduros y en desarrollo en el campo (precosecha) y aquella que daña frutos maduros en la cosecha y durante el almacenamiento (postcosecha); este último tipo de enfermedad es

ocasionado por cepas de *Colletotrichum* capaces de permanecer latentes u ocasionar infecciones quiescentes, en la cual el hongo infecta frutos inmaduros en el campo y permanece en estado de latencia hasta que el fruto madura, momento en el cual reactiva su crecimiento causando enfermedad en el fruto (Prusky y Plumbey, 1992; Prusky, 1996).

4.2.1 Antracnosis del tomate de árbol

La producción del tomate de árbol se da entre los 1.500 y 2.000 m.s.n.m. En estas alturas y especialmente en temperaturas entre 14 a 18°C acompañadas de humedad relativa alta y lluvias frecuentes, se presenta una de las afecciones fitosanitarias de mayor incidencia en el cultivo el tomate de árbol: la antracnosis, enfermedad que puede ocasionar la pérdida total de la cosecha si no se le da el manejo adecuado.

4.2.2 Síntomas

Es una enfermedad cuyo agente causal son especies del género *Colletotrichum*, que se dispersan mediante el viento, por la lluvia, por los insectos, o por el mismo agricultor. Este hongo coloniza hojas, ramas, flores y frutos y se caracteriza por la aparición sobre hojas y tallos jóvenes, de unas lesiones oscuras, hundidas, bien delimitadas por una o más aureolas

concéntricas, que posteriormente secan las zonas afectadas, dejándolas con la apariencia de una quemazón (Figura 1).

También pueden aparecer, a lo largo de las venas de las hojas unas manchas irregulares de color marrón claro correspondientes a tejido muerto, las plantas afectadas tendrán el aspecto de haber sido quemadas por el sol; lo anterior ocasiona una deformación de los frutos que en la mayoría de los casos termina produciendo su caída.

Figura 1. Síntomas de Antracnosis en Tomate de árbol (Fruto, Tallo y Hoja).



Fuente: GENPAT, 2010.

El estudio de Rondón (2002) muestra una amplia variabilidad (tamaños de las conidias, velocidad de crecimiento, morfología) en los aislados de *Colletotrichum* encontrados en tomate de árbol, que parece indicar la existencia de tres especies de este género: *C. acutatum*, *C. destructivum* y *C. gloeosporioides*, aunque estudios moleculares revelan únicamente la presencia de *C. acutatum* (Afanador- Kafuri *et al.*, 2003; Patiño *et al.*, 2007;

Portilla, 2012; Álvarez, 2013). La enfermedad al parecer está muy relacionada con el patrón de lluvias de la región y presenta dos períodos principales de infección, uno por semestre y al final de las lluvias, disminuyendo en épocas secas, durante las cuales mantiene una fase de latencia.

4.3 *Colletotrichum*

4.3.1 Características del género *Colletotrichum*

Colletotrichum se encuentra en la naturaleza en su estado asexual (o fase conidial), produce unas estructuras en forma de disco, con un diámetro de 300 μm , en forma subepidermal en la lesión llamados acérvulos; estos cuerpos presentan varias espinas o setas con 4 a 9 μm de diámetro y menos de 100 μm de longitud, los cuales están ubicados al borde o entre la masa de conidióforos simples y alargados; las conidias son hialinas, unicelulares y de forma ovoide; estas conidias tienen una vacuola cerca del centro y miden 2.5 - 5.5 x 11 - 20 μm . Bajo ciertas condiciones ambientales las setas pueden no presentarse; si se presentan, esta característica puede servir para diferenciarlo de otro género bastante similar, conocido como *Gloeosporium* (Bailey y Jeger, 1992).

4.3.2 Clasificación Taxonómica

Colletotrichum y su teleomorfo *Glomerella* han estado implicados en enfermedades en plantas (principalmente antracnosis) alrededor del mundo pero especialmente como la causa de los problemas pre-cosecha y post-cosecha en los trópicos. Su habilidad para causar infecciones latentes lo ubica entre los patógenos más importantes de la post-cosecha (Bailey y Jeger, 1992; Rodríguez, 2007).

Su distribución es mundial y actualmente el taxón se considera constituido por 39 especies (Sutton, 1992) entre las que se encuentran tanto saprófitas como parásitas. Las especies patogénicas causan serias pérdidas en un amplio número de plantas cultivadas como cereales, pastos, frutales, leguminosas, y cultivos perennes en regiones tropicales y subtropicales. Los síntomas de esta enfermedad son frecuentemente una lesión denominada antracnosis, pudiendo lesionar la mayor parte de la planta. Al menos tres distintas especies se han asociado a plantas de tomate de árbol: *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. destructivum* (Rondón, 2002).

Caracterización molecular por ITS. Según NCBI, 2007

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Sordariomycetes incertae sedis

Orden: Phyllachorales

Familia: Phyllachoraceae

Subfamilia: Phyllachoraceae mitospóricos

Género: Glomerella (anamorfo: *Colletotrichum*)

C. acutatum y *C. gloeosporioides* son morfológicamente muy similares, con rangos de hospederos solapantes, y los aislados en cultivo exhiben una gran variabilidad, lo que hace muy difícil separarlos por los métodos taxonómicos tradicionales. G

Un estudio detallado sobre una población diversa de *C. acutatum* proveniente de frutos dañados de *Lupinus* en Nueva Zelanda reportó que esta especie puede ser considerada como una especie grupo, *C. acutatum sensu lato*. Dentro de este grupo, cuatro grupos *C. acutatum sensu stricto* fueron distinguidos, uno de ellos incluía el grupo original descrito por Simmonds. Freeman *et al.*, (2001) caracterizaron aislados de *C. acutatum sensu Simmonds* provenientes de diferentes hospederos y diferentes regiones geográficas usando varios métodos moleculares, los cuales mostraron que existe una considerable diversidad genética entre los aislados de *C. acutatum*, catalogable en cuatro subgrupos (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

4.3.3. Estrategias de penetración de *Colletotrichum*

El proceso físico de colonización de *Colletotrichum* es similar en muchas de sus especies. Después de que la espora se adhiere al tejido hospedero, ésta forma un tubo germinativo que da origen a una estructura de infección llamada apresorio, de la cual emerge una estructura denominada “clavija de penetración”, que permite el paso directo a la cutícula (Bailey y Jeger, 1992; Zulfiqar *et al.*, 1996; Timmer *et al.*, 2000; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004) aunque también hay reportes de penetración indirecta a través de estomas o heridas sin formar apresorios, como el caso de *C. acutatum* en cítricos, el cual penetra los pétalos de flores. Después de la penetración ocurren diferentes estrategias de colonización de los tejidos:

a. Penetración intracelular hemibiotrófica

Se establece una infección inicial a través de una breve fase biotrófica asociada con una gran hifa primaria intracelular, proceso que puede durar desde menos de 24 horas hasta 3 días; convirtiéndose después en una fase necrotrófica destructiva asociada con una hifa secundaria angosta, la cual se ramifica a través del tejido del hospedero matando rápidamente las células del hospedero debido a la degradación de la pared celular por parte de las enzimas producidas por el hongo (Bailey y Jeger, 1992; Zulfiqar *et al.*, 1996; Timmer *et al.*, 2000; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

b. Penetración necrotrófica intramural, subcuticular

Una vez penetrada la cutícula, el patógeno no entra inmediatamente dentro del lumen celular, sino que se desarrolla debajo de la cutícula, entre la pared periclinal y anticlinal de las células epidermales. No es claro si las células del hospedante permanecen vivas, pero los síntomas solo aparecen hasta 24 horas después de la penetración. Finalizado el breve periodo asintomático, el hongo comienza a expandirse rápidamente a través del tejido del hospedero intra e intercelularmente, destruyendo las células vegetales y degradando las paredes celulares. El patógeno es favorecido por la lluvia, alta humedad ambiental y temperatura óptima para su desarrollo de 20°C, con un menor desarrollo a 27°C y un escaso desarrollo a los 5°C, 10°C y 30° C. La humedad en forma de salpicaduras de lluvia y agua corriente ayuda a la distribución y diseminación de conidias de *Colletotrichum*, sobre la misma planta o de una planta a otra (Bailey y Jeger, 1992; Zulfiqar *et al.*, 1996; Timmer *et al.*, 2000; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

En el caso de muchos frutales, pueden ocurrir otras estrategias de infección. Con *C. acutatum*, las interacciones pueden ser intracelular hemibiotrófica cuando infecta frutos maduros de cultivares susceptibles o necrotrófica intramural subcuticular cuando infecta frutos de cultivares resistentes (Timmer *et al.*, 2000; Warthon y Diéguez – Uribeondo, 2004)

En hojas de almendras ocurre una combinación de estas dos estrategias, resultando en una colonización biotrófica y una vez el hongo ha penetrado empieza la fase necrotrófica durante el crecimiento intercelular, seguido por una colonización inter e intracelular y la muerte del tejido (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

El mecanismo del cambio de la fase biotrófica a necrotrófica es incierto. *C. acutatum*, al igual que otras especies de *Colletotrichum*, producen amonio, causando incremento de pH durante el cambio a la fase necrotrófica. En muchas interacciones hospedero-patógeno, la interacción específica a nivel celular es desconocida y puede ser una combinación de las estrategias mencionadas anteriormente (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004). Estas estrategias pueden depender de los tejidos del hospedante, en algunos casos, por ejemplo, en almendra y muchos cítricos, los tejidos de pétalos de flores son infectados y la colonización ocurre sin la formación de apresorio y no existe la fase biotrófica (Zulfiqar *et al.*, 1996; Förster y Adaskaveg, 1999; Warthon y Diéguez – Uribeondo, 2004).

4.3.4. *Colletotrichum acutatum*

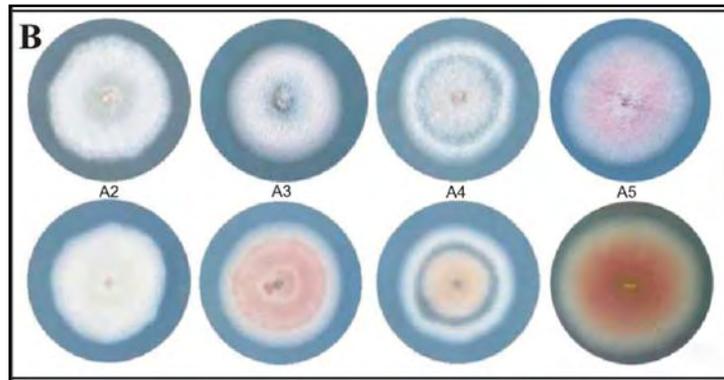
C. acutatum Simmonds ex Simmonds (1968) es un hongo de colonias blancas, que llegan a ser grasosas, en la superficie inferior de color rosado a

carmín (Figura 2). Carecen de esclerocios. Con apresorios pálidos a café oscuro, en forma ovalada o de clavo, con las márgenes enteras o ligeramente lobuladas de 8,5 – 10 x 4,5 – 6 μm . Masas de conidias de color rosado a naranja de 8,5 – 16,5 x 2,5 – 4 μm (Figura 3).

Se diferencia de *C. gloeosporioides* por su crecimiento lento (Rodríguez, 2007). *C. acutatum* crece en Agar Papa Dextrosa (PDA) mostrando conidias puntiagudas, las colonias son de color rosado o naranja, el radio de crecimiento es más lento comparado con el de *C. gloeosporioides*, la temperatura de crecimiento óptima es de 25°C, y presenta sensibilidad al benomil (Adaskaveg *et al.*, 1997).

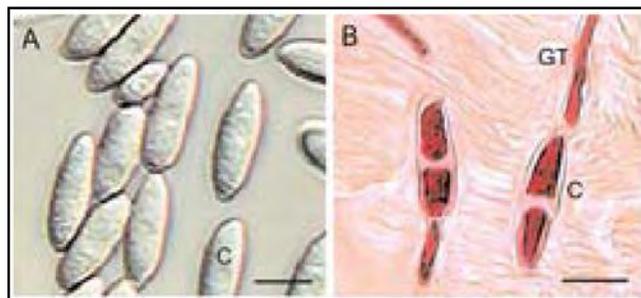
Estrada y Lagos (2011) y GENPAT (2010), caracterizaron morfológicamente aislados de *Colletotrichum* obtenidos de *Solanum betaceum* en los departamentos de Nariño y Putumayo, y establecieron 3 morfologías. La morfología 1 y 3 (Figuras 4 y 5), con caracteres morfológicos similares a *C. acutatum*, en las cuales la coloración de las colonias es blanco-grisáceo, además presentaron en promedio tasas de crecimiento mayores a las de los aislados con morfología similar a *C. gloeosporioides* (morfología 2).

Figura 2. Variabilidad morfológica de los aislados de *Colletotrichum acutatum* (arriba: anverso, abajo: reverso de la colonia), indicando diferentes grupos moleculares (A2-A5).



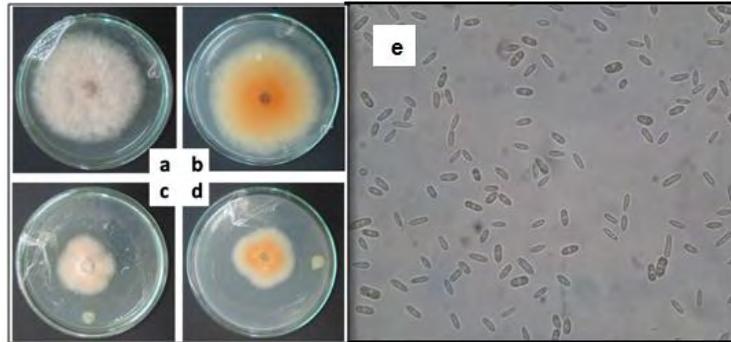
Fuente: Sreenevivasad y Talhinhos, 2005

Figura 3. Morfología microscópica de *C. acutatum*. A: conidia, B: conidia septada.



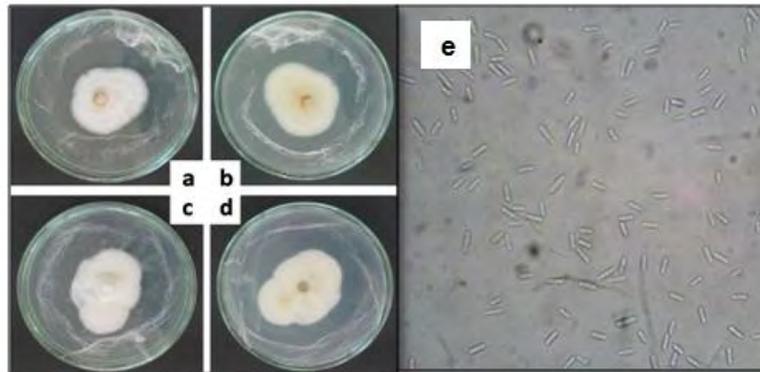
Fuente: Wharton y Diéguez- Uribeondo, 2004

Figura 4. Fotografías de aislados de *Colletotrichum* spp. del Putumayo con morfología 1. a) MP9176 Frontal, b) MP9176 Reverso, c) MP8002 Frontal, d)MP8002 Reverso. e) Conidias del aislado MP9176.



Fuente: GENPAT, 2010

Figura 5. Fotografías de aislados de *Colletotrichum* spp. del Putumayo con morfología 3. a) MP9184 Frontal, b) MP9184 Reverso, c) MP8077 Frontal, d)MP8077 Reverso, e) Conidias del aislado MP9184.



Fuente: GENPAT, 2010

La filogenia de *C. acutatum* y especies relacionadas han sido investigadas usando análisis de secuencias individuales y combinados de rRNA nuclear (ITS ADNr) y fragmentos de beta tubulina (Than *et al.*, 2008), *C. acutatum sensu lato* (Lardner *et al.*, 1999) representa la población global del patógeno la cual se divide en varios grupos morfológicos y moleculares

((Sreneviprasad y Talhinhos, 2005), incluyendo razas similares a las especies descritas por Simmonds (1965) y otras que varían en diferentes grados. El estado sexual de *C. acutatum* (*Glomerella acutata* J.C. Guerber y J.C. Correll) fue obtenido por el cruzamiento de aislados auto incompatibles de diferentes hospederos y diferentes localidades, incluyendo la especie tipo, y estos aislados corresponden al grupo A de *C. acutatum* (Johnston y Jones, 1997; Lardner *et al.*, 1999; Guerber y Correll, 2001). Aislados de *C. acutatum* obtenidos de tamarillo mostraron muy poca diversidad al analizarlos por PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR) y RAPD. La homogeneidad de estos aislados, podría deberse a la región de origen en donde un único cultivar está sembrado, lo cual sugiere una gran adaptación a su hospedero (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003). De gran interés, estos aislados se separaron en el grupo A8, el cual está relativamente relacionado con el A1.

4.3.5. *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz y Sacc. 1884)

Teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem. 1903)

Colletotrichum gloeosporioides (Penz. y Sacc.) fue descrito en el año 1884, es una especie de amplia distribución en todo el mundo especialmente en regiones tropicales y subtropicales. Von Arnx (1957), citó más de 600 sinónimos con otras especies de *Colletotrichum* Corda y *Gloesporium* Desm. y Mont., lo cual indica la gran diversidad del género. Aunque algunas de éstas especies han cambiado el nombre genérico, la gran mayoría se han

incluido dentro del grupo *C. gloeosporioides*. Por su parte, no todas las especies del género *Gloesporium* se han incluido en *Colletotrichum*, ya que se han determinado como *Marssonina*, *Cryptosporioides*, *Piggotia*, etc (Sutton, 1992). *C. gloeosporioides* muestra el mayor grado de diversidad morfológica y biológica y tiene el rango más amplio de hospederos de todas las especies de *Colletotrichum* (Du *et al.*, 2005).

Esta especie es heterogénea y en cultivo las características varían notablemente. Colonias variables, desde blanco grisáceas hasta gris oscuras, micelio aéreo, el reverso de las colonias puede presentar un color blanco grisáceo (Figura 6) que se oscurece cuando el cultivo es viejo (Sutton, 1992). El tamaño y la forma de las conidias y las características del apresorio varían considerablemente y son afectadas por el ambiente. Pocos progresos se han realizado en la sistemática e identificación de los aislados pertenecientes a este complejo basados exclusivamente en las características morfológicas. El tamaño y forma de las conidias y las características del apresorio varían considerablemente y son afectadas por el ambiente, además las especies de *Colletotrichum* producen conidias secundarias, las cuales son más pequeñas y varían en su forma, especialmente cuando el cultivo es viejo. *Colletotrichum gloeosporioides* se caracteriza por presentar conidias hialinas (12-17 x 3.5-6 μm), unicelulares (Figura 7), formando masas de color salmón pálido, rectas, cilíndricas, de ápice obtuso y base truncada, ubicadas en una estructura reproductiva llamada acérvulo (500 μm de diámetro). Estos cuerpos son en forma de

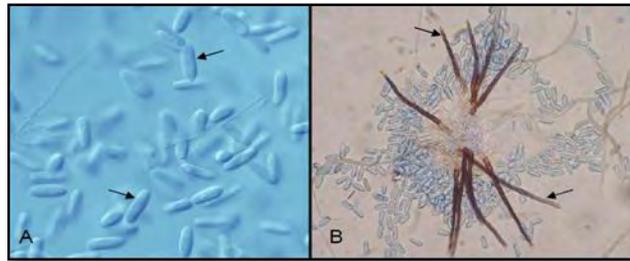
disco, cerosos subepidermales. Además de conidióforos y conidias, presentan setas en el borde del acérvulo o entre conidióforos, aunque a veces están ausentes (Bailey y Jeger, 1992). El hongo crece con facilidad en Agar PDA, inicialmente la colonia es cremosa y de color salmón, emitiendo un micelio blanco en sus bordes que con el tiempo se torna grisáceo. Su desarrollo completo se alcanza en 15 días a una temperatura de 25°C (Bailey y Jeger, 1992). Estrada y Lagos (2010), y GENPAT (2010), caracterizaron morfológicamente aislados de *Colletotrichum* obtenidos de *Solanum betaceum* en los departamentos de Nariño y Putumayo, e identificaron una morfología similar a *C. gloeosporioides* (morfología 2), en la cual se encontraron colonias de color blanco grisáceo en vista frontal y naranja grisáceo por el reverso, borde entero y esporulación gris (Figura 8).

Figura 6. Morfología macroscópica de *Colletotrichum gloeosporioides*



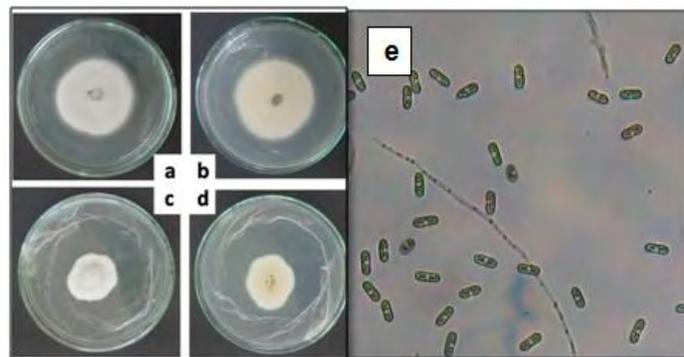
Fuente: Álvarez, 2002

Figura 7. Morfología microscópica de *C. gloeosporioides* A: conidias de *C. gloeosporioides* B: Setas de *C. gloeosporioides*.



Fuente: Gaztambide, 2005.

Figura 8. Fotografías de aislados de *Colletotrichum* spp. del Putumayo con morfología 2. a) MP9115 Frontal, b) MP9115 Reverso, c) MP9118 Frontal) MP9118 Reverso, e) Conidias del aislado MP9115.



Fuente: GENPAT, 2010

4.3.6. Caracterización molecular del Género *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* contiene una colección de hongos extremadamente diversa que incluye hongos tanto saprofitos como fitopatógenos. Estos últimos inicialmente se nombraron de acuerdo a la planta hospedera de la

cual se aisló; así fue como se describieron varios taxones, pero el esquema no es satisfactorio ya que esta forma no revela verdaderas relaciones entre las especies de hongos (Rodríguez, 2007).

La taxonomía de *Colletotrichum* es confusa, hay cerca de 900 especies descritas o asignadas a éste género. La identificación ha sido estudiada por sus características culturales y morfológicas, especialmente conidiales, presencia de setas, esclerocios y forma de los apresorios (Bailey y Jeger, 1992). Los métodos tradicionales no han sido satisfactorios para diferenciar entre especies de *Colletotrichum*, lo cual ha generado serias dificultades en la diagnosis confiable del patógeno en numerosos patosistemas y por lo tanto, la implementación de medidas de control (Sutton, 1992; Brown *et al.*, 1996; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996), por eso se sugiere utilizar diferentes marcadores moleculares, los cuales han sido utilizados exitosamente para diferenciar poblaciones de *Colletotrichum* (Kaufman y Weideman, 1996).

Dentro del género *Colletotrichum* el rango de características morfológicas y de las colonias han sido usadas para la identificación de especies. Caracteres como: la forma cilíndrica de las conidias y el rápido crecimiento de colonias grises de *C. gloeosporioides*, contrastan con la forma fusiforme de las conidias, y el lento crecimiento de las colonias rosadas de *C. acutatum* (Sutton, 1992). La sensibilidad diferencial al fungicida sistémico Benomil (Metil [1-(butilamino) carbonil] 1H- benzimidazol-2 il] carbamato) también ha

sido usada para distinguir entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* (Adaskaveg y Hartin, 1997).

Un estudio detallado de Talhinhos *et al.*, (2002) basado en morfología, compatibilidad vegetativa de grupos (VCG), y DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), sobre una población diversa de *C. acutatum* proveniente de frutos de *Lupinus* spp. en Nueva Zelanda reportó que esta especie puede ser considerada como una especie grupo, *C. acutatum sensu lato*. Dentro de este grupo, cuatro grupos *C. acutatum sensu stricto* fueron distinguidos. Uno de ellos incluía el grupo original descrito por Simmonds (1968).

En estudios realizados por Freeman *et al.*, (2001) se caracterizaron aislados de *C. acutatum sensu lato* provenientes de diferentes hospederos y diferentes regiones geográficas usando varios métodos moleculares; ellos mostraron que existe una considerable diversidad genética entre los aislados de *C. acutatum*, catalogable en cuatro subgrupos. Hace pocos años, *C. acutatum* ha sido identificado como el agente causal de antracnosis en lugar del ampliamente reconocido *C. gloeosporioides* (Brown *et al.*, 1994; Martín y García-Figueroa, 1999; Freeman *et al.*, 2000, Wharton y Diéguez-Urbeondo, 2004).

4.3.6.1. Métodos moleculares de identificación de *Colletotrichum*

El problema con la taxonomía de *Colletotrichum* spp. reside en que produce conidias secundarias provenientes de las conidias de germinación inicial. Estas esporas secundarias generalmente son variables en tamaño y dificultan la identificación (Buddie *et al.*, 1999). Debido a estos problemas se han utilizado una variedad de métodos moleculares para discriminar entre especies de *Colletotrichum* ya que los criterios morfotaxonómicos no son precisos (Freeman *et al.*, 1996). Existen diferentes métodos para detectar polimorfismos entre los que se encuentran la amplificación del ADN al azar (RAPDs), la digestión de ADN con enzimas de restricción (RFLPs) y amplificación de regiones no conservadas del ADN ya sean ribosomales (ITS) o intergénicas (IGS). En estas técnicas se usa ADN extraído directamente del individuo en grandes cantidades, o con fragmentos de ese ADN amplificado mediante la técnica PCR. Aunque las regiones ITS representan solo una parte del genoma, estas son suficientemente variables para facilitar la separación a nivel de género y son frecuentemente útiles a nivel de especies en los ascomicetes (White *et al.*, 1990).

Técnicas moleculares en Coelomycetes

La aplicación de técnicas moleculares en Coelomycetes iniciaron alrededor de 1990 con estudios sobre ADNr como marcador taxonómico molecular

(Braithwaite *et al.*, 1990) para un rápido y detallado análisis genético de los polimorfismos - variación de las secuencias de ADN a ARN - en el grupo de especies de *Colletotrichum gloeosporioides* (Trigiano *et al.*, 1995). Estos procedimientos emplearon análisis de comparación de isoenzimas de 11, 13, o 19 sistemas a nivel de proteínas (Bonde *et al.*, 1991; Meijer *et al.*, 1994; Kaufman y Weideman, 1996); análisis de secuencias mediante la amplificación por PCR de la región (ITS) del rRNA (Mills *et al.*, 1992; Rehner y Uecker, 1994; Sherriff *et al.*, 1994, 1995; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Johnston y Jones, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Uddin *et al.*, 1998); AFLPs de ADN genómico (Majer *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1997); RFLPs de rRNA, ADN mitocondrial (mtDNA), y ADN genómico (Braithwaite *et al.*, 1990; Vaillancourt y Hanau, 1992; Hodson *et al.*, 1993; Alahakoon *et al.*, 1994; Riccioni *et al.*, 2003); RAPDs (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Freeman *et al.*, 1993; Blakemore *et al.*, 1994; Trigiano *et al.*, 1995; Freeman y Katan, 1997; Mackie y Irwin, 1998); análisis de cebadores específicos de la región del espaciador interno transcrito 1 del ADN ribosomal (rRNA-ITS1) (Brown *et al.*, 1996; Adaskaveg y Hartin, 1997; Freeman *et al.*, 2000).

Métodos moleculares para especies de *Colletotrichum*

Las especies de *Colletotrichum* fueron agrupadas o clasificadas utilizando RFLPs generados por las endonucleasas *MvnI*, *PvuII*, y *ScrFI* (Martínez-

Culebras *et al.*, 2000), múltiples loci de la secuencia de nucleótidos de la subunidad pequeña del rRNA mitocondrial (mtSSU) y un fragmento de la secuencia del gen de la β -tubulina combinado con la secuencia de los ITS (Vinnere, 2004), dos secuencias nucleotídicas de la β -tubulina (Talhinhas *et al.*, 2005), secuencias combinadas del espaciador interno transcrito del ADN ribosomal (rRNA-ITS) con secuencias parciales de la β -tubulina (Lubbe *et al.*, 2004), y secuenciación de la región rRNA-ITS1 (Moriwaki *et al.*, 2002; Photita *et al.*, 2005). Estas técnicas arrojaron resultados que confirmaron los caracteres tradicionales de la taxa como características morfo – culturales, fisiológicas y patogénicas.

Las especies complejas de *Colletotrichum* como *C. acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. graminícola* han sido clasificadas usando análisis de PCR con primers específicos (Freeman *et al.*, 2000; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Kulik, *et al.*, 2005), análisis de PCR-RFLP y/o análisis de secuencias de el ADNr (ITS1-5-8S-ITS2) (Martín y García-Figueroa, 1999; Martínez-Culebras *et al.*, 2000; Abang *et al.*, 2002; Guerber *et al.*, 2003), RAPD-rRNA (Kuramae-Izioka *et al.*, 1997; Saha *et al.*, 2002), análisis con “primer” arbitrario PCR- β -tubulina con dos secuencias de nucleótidos, análisis de rRNA-ITS y AFLP (Sreenivasaprasad *et al.*, 1994; Talhinhas *et al.*, 2002, 2005), y análisis de isoenzimas (Buddie *et al.*, 1999).

Regiones de rRNA

Las regiones del rRNA seleccionados como potenciales marcadores moleculares difieren en su utilidad, productividad y diversidad para obtener datos para las investigaciones. La región rRNA-ITS1 muestra un alto grado de divergencia intra e interespecífico más que la región del espaciador interno transcrito 2 del ADN ribosomal (rRNA-ITS2), y la región rRNA-ITS muestra además inferencias entre las relaciones filogenéticas entre especies de *Colletotrichum* (Sreenivasaprasad *et al.*, 1994, 1996). Por otro lado, la región completa del rRNA (ITS1 + ITS2) permite obtener más información sobre la diversidad genética que solo la región ITS1 (Freeman *et al.*, 2001).

Los datos moleculares y morfológicos en especies de *Colletotrichum* no han sido concordantes en los clusters obtenidos mediante las secuencias de su rRNA-ITS (Sherriff *et al.*, 1994; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Munaut *et al.*, 2002). Esta disparidad podría atribuirse a su limitada capacidad de detectar variaciones genéticas, en contraste a los análisis de RAPD. Existen técnicas alternativas que pueden ayudar a solucionar este conflicto (Yang y Sweetingham, 1998).

Marcadores alternativos

Los análisis de las secuencias RFLP-ADNr (ITS1-5-8S-ITS2) (Martín y García-Figueroa, 1999), análisis de (AP) PCR y regiones de ADN ricas en A + T (Freeman *et al.*, 2001), y la secuenciación del gen de la β -tubulina 2, han clasificado a las poblaciones globales de *C. acutatum* dentro de 8 grupos moleculares distintos, A1– A8, los cuales se han correlacionado con los grados de variación, los parámetros morfológicos, la asociación a hospederos y la distribución geográfica (Sreenivasaprasad y Talhinhas 2005; Talhinhas *et al.*, 2005).

Se han usado iniciadores arbitrarios (decámeros) para detectar la diversidad genética en *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* (Bridge *et al.*, 1997). En esos análisis los fragmentos generados sugirieron que *C. acutatum* podría estar ubicado en siete grupos, con menores variaciones dentro de un grupo. Las cepas de *C. gloeosporioides* de fresa no mostraron variación y fueron idénticos a un grupo de *C. fragariae*.

Con análisis de RFLP se observaron altos niveles de variación entre las cepas de *C. gloeosporioides* de plantas tropicales, con la excepción de cepas obtenidas de mango donde fueron encontrados pocos polimorfismos (Prusky *et al.*, 2000).

En otro estudio realizado por Freeman y Rodríguez (1995) se encontró que existe variación entre las especies identificadas como *C. gloeosporioides*. Denoyes-Rothan *et al.*, (2003) estudiaron patrones de RAPD de 14 aislados de *C. gloeosporioides* y estos patrones mostraron un alto nivel de polimorfismo entre aislados. Brown *et al.*, (1996) estudiaron diferentes aislados de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* y se amplificó el ADN ribosomal por el método de PCR con los primers específicos (CaInt2 y CgInt) y el iniciador ITS4. A través de la secuenciación de nucleótidos complementado con el método RFLP, se pudieron reclasificar los aislados de *C. acutatum* previamente clasificados como *C. gloeosporioides*, basados en la morfología de los conidias.

4.4. Gen de la β -tubulina

Comúnmente, se denomina tubulina a un heterodímero formado por dos subunidades (α y β) que al ensamblarse de manera altamente organizada genera uno de los principales componentes del citoesqueleto, los microtúbulos. Todas las células eucariotas presentan microtúbulos, lo cual indica que las subunidades que los conforman probablemente se originaron cuando los eucariotas aparecieron por vez primera, hace aproximadamente 1.5 billones de años (Little *et al.*, 1988).

La tubulina es una proteína globular que se constituye como uno de los mayores componentes de microtúbulos de las células eucariotas. Los microtúbulos están involucrados en todos los movimientos a nivel del citoplasma de todas estas células jugando una labor fundamental durante la mitosis, ya que son los encargados de la división y desplazamiento del material celular y determinan además el crecimiento celular y son los responsables de la formación de los husos mitóticos en la fase M del ciclo celular y el transporte axonal entre otras (Gómez *et al.*, 2007).

La familia de las tubulinas está formada por las tubulinas alfa (α), beta (β) y gamma (γ), que comparten una identidad entre sus cadenas de aminoácidos de 35-40%, aunque su similitud con cualquier otra proteína conocida es mínima (Little *et al.*, 1988). Las tubulinas α y β son las subunidades esenciales de los microtúbulos, mientras que la tubulina- γ es un componente fundamental del centrosoma. La proteína beta tiene 445 aminoácidos y está codificada por cuatro exones localizados en el brazo corto del cromosoma 6, en concreto en la región 6p del mismo cromosoma.

Las dos subunidades son capaces de unirse al Guanosín Trifosfato (GTP), pero se ha comprobado que la subunidad alfa tiene un papel predominantemente estructural, mientras que la beta está implicada directamente en el proceso de polimerización, despolimerización y mitosis. Este proceso es fundamental para la célula, ya que para que se complete el

ciclo celular, y ésta entre en mitosis, es preciso que la tubulina se despolimerice y se puedan separar las dos células resultantes del proceso (Gómez *et al.*, 2005).

4.4.1. Conservación de las tubulinas α y β

Puesto que las proteínas de la familia de la tubulina tienen un origen muy antiguo, podría esperarse que sus secuencias presentaran una gran divergencia. Sin embargo, esto sólo es cierto para el extremo C-terminal de las tubulinas α y β . Los fragmentos N-terminales están notablemente conservados con variaciones mínimas. Este alto grado de conservación está seguramente impuesto por las limitaciones estructurales de la polimerización y despolimerización de microtúbulos (MTs), conjuntamente con las limitaciones impuestas por la asociación de proteínas como las kinesinas y dineínas (Burns, 1991). Los miembros individuales de la familia de las tubulinas de los distintos órdenes filogenéticos han evolucionado de una manera excepcionalmente lenta, a una tasa comparable la de las histonas o la actina (Doolittle, 1992). La alta tasa de conservación dentro de la familia de las tubulinas implica que las propiedades funcionales de estas proteínas imponen unas limitaciones enormes a cualquier diversificación de la secuencia, de manera que las mutaciones sólo pueden acomodarse en unas pocas posiciones sin producir un efecto deletéreo. Por otro lado, una modificación que se haya conservado probablemente sea funcionalmente

ventajosa, y por ello estará seguramente relacionada con propiedades específicas de las tubulinas en órdenes diferentes.

Para los análisis moleculares se utiliza esta proteína por su carácter altamente conservado y común a todos los eucariotas, y porque al conocerse los aminoácidos que la componen en diferentes especies de eucariotas, es posible establecer comparaciones entre organismos diferentes e incluso entre miembros de una misma especie, ya que se hace posible distinguir organismos que poseen alelos para β -tubulina diferentes, mediante evaluación de intrones del gen que codifica para esta proteína (Cruz, 2003).

El gen de la β -tubulina se expresa generalmente en niveles altos durante el crecimiento celular y su secuencia nucleotídica ha sido usada muy frecuentemente en análisis filogenéticos para distinguir entre diferentes especies y/o diferentes subgrupos dentro de una especie. Los polimorfismos en el intrón 3 han sido los más explotados para realizar estudios filogenéticos (Amrani y Corio – Costet, 2006). O' Donnell *et al.*, (1998) reportó que hay 3.5 veces más información filogenética en los de la β - tubulina que en los genes del ADNr y lo propuso como un marcador útil para estudiar relaciones cercanas en el género *Fusarium*.

Basado en la secuencia nucleotídica de la región variable del gen β -tubulina 2 (un fragmento de ~550 pb incluyendo tres diferentes intrones), se

diseñaron cebadores específicos para *C. acutatum* (TBCA) y *C. gloeosporioides* (TBCG). Usando los cebadores específicos de la *tub 2* para las especies *C. acutatum* (TBCA y TB5) y *C. gloeosporioides* (TBCG y TB5) se identificaron más de 125 aislados de *Colletotrichum* spp. de olivo y otros hospederos como *C. acutatum* (Talhinhas *et al.*, 2005). Estos iniciadores basados en una única copia del gen *tub 2* (Panaccione y Hanau, 1990), constituyen una alternativa adicional en la utilización de las regiones ITS (Mills *et al.*, 1992; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996).

El fungicida benzimidazol inhibe la división mitótica por interferencia con la polimerización de la tubulina (Davidse y Flach, 1977; Ishii y Davidse, 1986). Los análisis moleculares del gen de la β -tubulina han revelado que la sustitución de aminoácidos en la β -tubulina confiere resistencia al benzimidazol (Thomas *et al.*, 1985; Orbach *et al.*, 1986; Jung y Oakley, 1990; Fujimura *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1992; Koenraadt *et al.*, 1992)

Una sustitución en el aminoácido 198 o codón 200 de la β -tubulina ha sido identificada en aislados de varios hongos filamentosos resistentes al benomil (Jung *et al.*, 1992; Koenraadt *et al.*, 1992; Yarden y Katan, 1993; Buhr y Dickman, 1994; Albertini *et al.*, 1999; Peres *et al.*, 2004). Una sustitución de ácido glutámico (Glu) por lisina (Lys) en el codón 198 fue encontrado en pocos aislados de *C. acutatum*, los cuales no son altamente resistentes al metil - tiofanato (Ishii, 2002; Chung *et al.*, 2006). Esto sugiere que la

inherente resistencia al benomil de *C. acutatum* fue causada por una mutación puntual en el codón 198 en la β -tubulina (Nakaune y Nakano, 2007).

La mayoría de los hongos poseen un gen para la β -tubulina, sin embargo en el genoma de *C. graminícola*, *C. gloeosporioides f.sp. aeshynome*, *Aspergillus nidulans* y *Trichoderma graminícola* se han reportado dos genes para la β -tubulina (Cruz, 2003). El gen de la β -tubulina 1, está implicado principalmente en el desarrollo de conidias, mientras que el gen de la β -tubulina 2 sería requerido para la germinación de la espora y expresado en el micelio vegetativo. Este gen β -tubulina 2 es producto de una mutación puntual en el gen altamente conservado β -tubulina, que confiere resistencia al fungicida sistémico Benomil en *Neurospora crassa* y en *Aspergillus nidulans*, el cual se une a la subunidad β -tubulina (β Tub) de los microtúbulos para inhibir el crecimiento de muchos hongos. En *C.gloeosporioides f. sp. aeshynomene*, se ha reportado la secuencia de nucleótidos de un segundo gen para la β -tubulina (Buhr y Dickman, 1994).

El gen β -tubulina 2 se expresa en el micelio vegetativo, es considerado un gen estructural. Dicha expresión es metabólicamente activa en la formación del micelio vegetativo. El alto nivel de transcripción de la β -tubulina 2 en conidias sin germinar sugiere que la β -tubulina codifica la β -tubulina 2 cuando ésta es requerida, inmediatamente después de la germinación de la

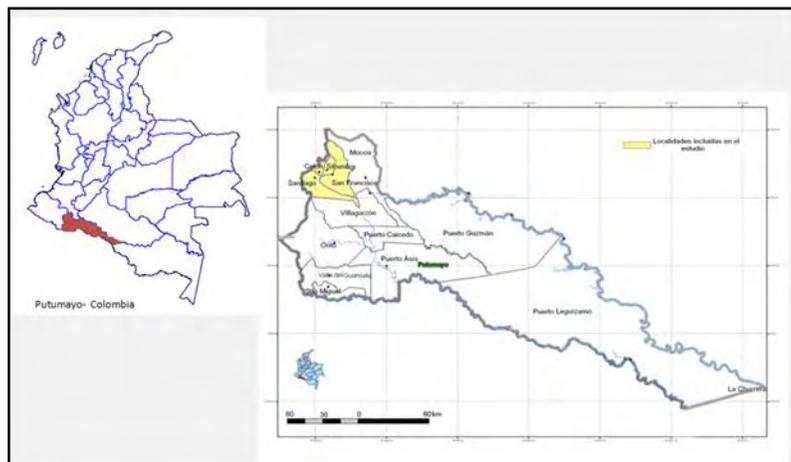
espora. Hay dos sets de genes que son requeridos para la transición de una espora sin germinar a una germinada. Esta transferencia induce la expresión de otro set de genes que son requeridos para la elongación del tubo germinativo. Muchos de éstos son también presumiblemente expresados durante el crecimiento hifal. El gen de la β -tubulina 2 está presente también en el proceso de elongación del tubo germinativo. Los transcritos de la codificación divergente del gen de la β -tubulina, β -tubulina 1, de *C. gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* fueron detectados en el micelio reproductivo pero no en el micelio vegetativo. Así, el producto proteico de la β -tubulina 1 aparece en el desarrollo de las conidias (Buhr y Dickman, 1997).

5. METODOLOGÍA

5.1 Área de Estudio

Los aislados caracterizados hacen parte del cepario de *Colletotrichum* spp. del Grupo de Investigación Genética y Evolución de organismos Tropicales (GENPAT) de la Universidad de Nariño, obtenidos de cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) de los municipios del Valle de Sibundoy (Santiago, Colón, Sibundoy y San Francisco) departamento del Putumayo (Figura 9).

Figura 9. Localización del Departamento del Putumayo y municipios muestreados en el estudio.



Fuente: mapa modificado de <http://www.colombiassh.org/site/> recuperado el 15 de Octubre de 2013

El departamento del Putumayo se ubica en el extremo sur del país (latitud 0° 40' S y 1° 25' N, y longitud 73° 50' y 77° 10' O), se caracteriza por presentar

territorios que se extienden desde el piedemonte de la cordillera andina hasta la llanura amazónica.

El Valle de Sibundoy se encuentra ubicado en la zona occidental del departamento, en límites con el departamento de Nariño tiene forma de una gran elipse de aproximadamente 52.500 hectáreas y cubre una zona de aproximadamente 151.932 Km² en donde se encuentran localizadas las comunidades definidas para el muestreo de solanáceas: Santiago (1.15'N 77.01'O), Sibundoy (1.18'N 76.89'O) y San Francisco (1.18'N 76.88'O). Hace parte de la región andino amazónica del Departamento del Putumayo es una región montañosa, en la que sobresalen los cerros Patascoy y Putumayo, con alturas que sobrepasan los 3.500 m y en la que su conformación topográfica muestra los climas cálido, medio, frío y páramo. La temperatura media anual es de 16.3 °C, con T° máxima de 21.7 °C y una T° mínima de 10.3 °C, presenta humedad relativa del 85%, la precipitación anual es de 1.400 mm aproximadamente. La altitud varía entre los 2.000 y 3.700 m.s.n.m. El brillo solar varía entre 500 y 700 horas/año (h/año), con un valor anual de 669.9 h/año, con promedio mensual de 55.83 h/mes; el período de mayor expresión se presenta en el mes de enero 81.52 h/año, coincidiendo con la época de verano o de pocas lluvias y el menor registro en el mes de abril con 35.01 h/mes, en la época de intensas lluvias (Opción Putumayo, 2007)

5.2. Multiplicación de los aislamientos y obtención de ADN

Se usaron 50 aislados monóspóricos de poblaciones de *Colletotrichum* spp., disponibles en el cepario del grupo de Investigación GENPAT (Tabla 1), los cuales se encontraban en conservación en medio agar PDA incubados a temperatura ambiente (14°C).

Los aislamientos se multiplicaron siguiendo el protocolo usado por Álvarez y colaboradores (2002) con algunas modificaciones, sembrando una asada de micelio en un medio líquido Papa- Peptona (infusión de 300 g de papa, 7 g/L de sacarosa y 20 g/L de peptona), e incubándolos durante 10 días a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se recogió y filtró el micelio usando papel filtro de poro fino (2 – 3 µm) y papel absorbente estéril, y fue depositado en cajas petri estériles para secarlo en cámara de flujo laminar durante 10 horas, luego se maceró en nitrógeno líquido y se depositó en tubos Falcon de 15 ml. Utilizando 0,5 g de micelio seco macerado por tubo, se realizó la extracción del ADN de cada aislamiento siguiendo el protocolo descrito por Griffith y Shaw (1998) con algunas modificaciones (Anexo A)

Tabla 1. Datos de colección de los aislados de *Colletotrichum* del Putumayo. (GENPAT, 2010)

Código de colección	Parte de la Planta	Cultivar de S. <i>betaceum</i>	Localización Municipio/Vereda	Propietario	Fungicidas usados por los agricultores/Observaciones
MP9175	Fruto	Común	Sibundoy/Sagrado Corazón	Juan Luna García	Cymoxanil, Mancozeb
MP8003	Fruto	Holandés	Santiago/Muchivioy	Ever Noguera	Daconil, Brestanid, Ridomil, Fitorax, Rodax
MP8004	Hoja	Hibrido	Santiago/Muchivioy	Ever Noguera	Daconil, Brestanid, Ridomil, Fitorax, Rodax
MP8076	Fruto	Común	Colón/San Pedro	Manuel Gaviria	NR
MP8083	Hoja	Común	Colón/ Las Palmas	Rosa Quinchoa	NR
MP8096	Tallo	Común	Santiago	Gloria Cuatindioy	NR
MP9117	Fruto	Común	San Francisco/Barrio Botero	Victor Burbano	No fumiga
MP8109	Fruto	Injerto	San Francisco/Chinayaco	Edgar Meneses	Ridomil e insecticidas
MP9111	Fruto	Común	Sibundoy	NR	NR
MP9133	Fruto	Holandés	San Francisco/San Silvestre	Ovidio Zamora	Ridomil, Daconil y Fitorax
MP9146	Fruto	Hibrido	Sibundoy/Las Cochas	Jose Jajoy	NR
MP8013	Fruto	Común	Santiago/ La Yé	Rosa Cuatindioy	No fumiga, huerta casera
MP8020	Fruto	Común	Colón/ Barrio Las Américas	Andrés Goyes	Cultivo devastado
MP8022	Fruto	Común	Colón/ Barrio el Centro	Inés Martínez	Cultivo devastado
MP8023	Fruto	Injerto	Colón/ Av. Los Termales	Salvador Chasoy	Huerta Casera
MP8024	Fruto	Injerto	Colón/ Av. Los Termales	Salvador Chasoy	Huerta Casera
MP8025	Fruto	Injerto	Colón/ Av. Los Termales	Salvador Chasoy	Huerta Casera
MP8026	Fruto	Común	Santiago / San Andrés	NR	NR
MP8047	Hoja	Común	Santiago/ Vichoy	Clemencia Jacanamejoy	Ridomil, Carbendazim
MP8050	Fruto	Hibrido	Santiago/ Vichoy	Clemencia Jacanamejoy	Ridomil, Carbendazim
MP8063	Tallo	Común	Santiago/ Vichoy	Margarita Jacanamejoy	Ridomi, Silvacure
MP8070	Hoja	Hibrido	Colón/San Pedro	Rodrigo Ceballos	Score, Brestanid, Carbendazim
MP8072	Hoja	Hibrido	Colón/San Pedro	Rodrigo Ceballos	Score, Brestanid, Carbendazim
MP8074	Fruto	Común	Colón/San Pedro	Luis Bernardo Ceballos	Ridomil, Brestanid
MP8077	Fruto	Holandés	Santiago / El Diviso	Estela Castro	NR
MP8078	Fruto	Común	Colón / La Josefina	Elkin Gustín	Dithane, Vitavax
MP8082	Fruto	Común	Colón / Las Palmas	Jaime Timaná	Curaxil, Rodax, Mancozeb
MP8086	Fruto	Hibrido	Santiago / Vichoy	Elkin Gustín	Dithane, Vitavax
MP8088	Fruto	Hibrido	Santiago/ Tamauca Viejo	Berenice Rosero	NR
MP8094	Hoja	Hibrido	Santiago/Quinchoapamba	Roberto Arciniegas	NR
MP8097	Fruto	Holandés	Santiago / Balsayaco	Milton Zamudio	NR
MP8098	Hoja	Común	San Francisco	Manuel Carlosama	NR
MP9112	Hoja	Injerto	Sibundoy	NR	NR
MP9118	Tallo	Común	San Francisco/Barrio Botero	Victor Burbano	No fumiga
MP9127	Hoja	Hibrido	San Francisco / La Menta	Justo Miticanoy	NR
MP9137	Fruto	Hibrido	San Francisco / La Menta	Marcelino Jamioy	NR
MP9148	Fruto	Común	San Francisco /Central San Antonio	Victoriano Yela	Mancozeb
MP9150	Fruto	Injerto	San Francisco/ San Silvestre	Pastora Jamioy	NR

Código de colección	Parte de la Planta	Cultivar de S. <i>betaceum</i>	Localización Municipio/Vereda	Propietario	Fungicidas usados por los agricultores/Observaciones
MP9151	Fruto	Hibrido	San Francisco /Central San Antonio	Jaime Luna	Derosal, Carbendazim, Ridomil, Daconil, Fitorax
MP9160	Fruto	Común	San Francisco / San José del Chunga	Jhoana Pejendino	Curaxil
MP9168	Fruto	Holandés	San Francisco /Central San Antonio	Ignacio Rosero	NR
MP9171	Fruto	Común	Sibundoy / San Félix	NR	NR
MP9172	Hoja	Común	Sibundoy / San Félix	Pastora Juagibioy	NR
MP9179	Fruto	Común	Sibundoy / Bella Vista	NR	NR
MP9184	Fruto	Injerto	Sibundoy / Villa Fátima	José Yela	NR
MP9185	Fruto	Común	Sibundoy / Cabuyayaco	Gonzalo Taimbo	NR
MP9187	Fruto	Común	Sibundoy / Villa Fátima	Paulo Angulo	NR
MP9190	Fruto	Común	Sibundoy / Villa Flor	Zoila Botina	NR
MP9192	Fruto	Injerto	Sibundoy / San Félix	Miriam Insuasty	NR
MP9115	Tallo	Común	San Francisco	NR	NR

*Código de colección: M: cultivo monospórico; P: Putumayo; Año de colección: 8 (2008) ó 9 (2009).

NR: no registra

5.3. Amplificación y Secuenciación de la región variable del gen de la β -tubulina tub2.

Mediante la técnica de PCR se amplificó un fragmento de aproximadamente 1030 pb del gen β -tubulina 2 utilizando los cebadores citados en la Tabla 2, y se probó las condiciones de PCR reportadas por Talhinhos *et al.*, 2002 con algunas modificaciones (Tablas 3 y 4).

Tabla 2. Cebadores para amplificar un fragmento del gen β -tubulina 2.

Nombre del cebador	Secuencia (5' -3')
TB5	5'-GGTAACCAGATTGGTGCTGCCTT-3'
TB6	5'-GCAGTCGCAGCCCTCAGCCT-3'
TB9	5'-AGCAGATGTTTCGACCCCAAG-3'
TB10	5'-CTCCTCGTCAACACCAGCGT-3'

Fuente: Talhinhos *et al.*, 2002

Cebadores TB5 y TB6 para amplificar y secuenciar la región variable 1, abarcando los exones 3, 4, 5 y parte del 6.

Cebadores TB9 y TB10 para explicar la región variable 2, abarcando parte de los exones 6 y 7.

Condiciones de la PCR. Las condiciones que se usaron para realizar la amplificación por PCR de la región 2 del gen de la Beta Tubulina se describen en las tablas 3 y 4 (Talhinhas *et al.*, 2002 con modificaciones)

Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR con primers TB5-TB6, del gen de la β -tubulina 2. Protocolo modificado.

Reactivos	Ci ([inicial])	Cf ([final])	Vrx (Vol por reacción)
Agua	-	-	9,2 uL
Buffer PCR	10X	1X	3.5 uL
dNTP's	2.5mM	0.2mM	2,8 uL
MgCl ₂	2.5mM	1.5mM	2,1 uL
Primer	10uM	1uM	3,5 uL
TaqPol	5U	2U	0,4 uL
ADN	100ng	15ng	5 uL

Fuente: Este estudio.

Tabla 4. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR con primers TB9-TB10, del gen de la β -tubulina 2. Protocolo modificado.

Reactivos	Ci ([inicial])	Cf ([final])	Vrx (Vol por reacción)
Agua	-	-	15,7 uL
Buffer PCR	10X	1X	3.5 uL
dNTP's	2.5mM	0.2mM	2,8 uL
MgCl ₂	2.5mM	1.5mM	2,1 uL
Primer	10uM	1uM	3,5 uL
TaqPol	5U	2U	0,4 uL
ADN	100ng	15ng	3,5 uL

Fuente: Este estudio.

Los ciclos de amplificación fueron los siguientes:

25 ciclos de amplificación.

Desnaturalización a 94°C por 30 segundos (120 segundos para la inicial)

Apareamiento a 65°C por 30 segundos.

Extensión a 72 °C por 120 segundos (240 segundos para la final).

Visualización y análisis de productos

Para la visualización y análisis de productos amplificados se prepararon geles de agarosa al 0,9% suplementado con Bromuro de etidio, y buffer TBE

0,5 X (Trisma base, ácido bórico y EDTA). Las condiciones de la electroforesis fueron de 45 minutos a 100 voltios, y la visualización se realizó usando un transiluminador UV. Como control negativo se utilizó una muestra sin ADN, el marcador usado para determinar el tamaño y concentración del amplificado fue un marcador de ADN de 1 Kb, y un Lambda de ADN de 50 ng respectivamente marca Fermentas. Como controles positivos se amplificaron dos cepas caracterizadas molecularmente como *C. gloeosporioides* (V016) y otra como *C. acutatum* (V064), las cuales fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Los amplificados obtenidos se almacenaron a -20 °C.

Una vez obtenidos los productos de PCR, éstos se enviaron a la compañía Macrogen (Corea del Sur), en donde fueron purificados y secuenciados (Standard-seq Single) en un secuenciador 3730XL (AppliedBiosystems). Se enviaron 30 µl de los 50 amplificados, en tubos de PCR sellados con papel parafinado, en una nevera de icopor.

5.4. Análisis estadístico

Edición, Corte y Análisis de Secuencias

La calidad de los electroferogramas resultantes se verificaron y editaron usando el programa Chromas Lite 2.01 disponible online (Copyrighth 1998-2005 Technelysum Pty Ltd. <http://www.technelysum.com.au>). Posteriormente

se realizó el corte, edición final y los contings de las secuencias usando el programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall, T. A. 1999).

Se realizó la comparación de las secuencias parciales obtenidas del gen de la Beta tubulina 2 contra aquellas disponibles en la base de datos del GenBank usando BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) en línea en el NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para realizar el análisis filogenético, inicialmente se alinearon las secuencias en el programa CLUSTAL W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994), posteriormente se determinó el modelo de la tasa de evolución nucleotídica usando el programa MEGA 5.0. (Tamura *et al.*, 2011).

Para los análisis filogenéticos se usó el método de ML, el cual intenta estimar la cantidad de cambio real de acuerdo con un modelo establecido. Este método evalúa la hipótesis (el árbol) mediante una función (verosimilitud) que maximiza la probabilidad de obtener los datos –matriz de secuencias de ADN– dado el árbol y el modelo evolutivo. De esta forma, conforme al criterio de ML el mejor árbol de cuatro secuencias conectadas dos a dos es aquel que presenta el mayor valor de verosimilitud, independientemente del número de transformaciones de estados de carácter que necesite. (De Luna *et al.*, 2005)

Se realizaron los análisis filogenéticos con las secuencias alineadas bajo el criterio de máxima verosimilitud (ML) en MEGA 5.0, eligiendo como grupo externo a *Neurospora crassa*, el soporte del filograma se obtuvo con la prueba de bootstrapping con 1000 réplicas en el programa MEGA 5.0. Clados con soporte de análisis de remuestreo superior a 75% se asumieron como buenos, y aquéllos con soporte inferior a 75%, como bajo.

El análisis de AMOVA se realizó en el programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006), utilizando una matriz de haplotipos calculada previamente en DNAsp 5.0 (Librado y Rozas, 2009).

El polimorfismo genético fue evaluado con el programa DnaSP v.5, mediante el cálculo de una serie de medidas de variación en el ADN. Los parámetros calculados incluyen: el número de sitios segregantes (S), el número de haplotipos (h), la diversidad haplotípica (H_d), la diversidad nucleotídica (π y θ). Este mismo programa fue usado para evaluar desviaciones del modelo neutral de evolución molecular mediante el cálculo de los estadísticos D de Tajima (1989), para determinar si las secuencias analizadas siguen un modelo molecular neutral, o están afectadas por algún tipo de selección natural. El estadístico D (Tajima, 1989) compara dos estimadores de la cantidad de variación genética (θ) de un grupo de secuencias. La primera es obtenida a partir del número total de sitios polimórficos en la muestra de secuencias y la segunda como la proporción de diferencias nucleotídicas

entre las secuencias comparadas por pares. Ambos estimadores deben ser iguales bajo una situación de evolución neutral (no selección, no recombinación, no subdivisión poblacional, no cambios en el tamaño poblacional). El estadístico D se basa en la diferencia entre ambas estimas y tiene media cero y desviación 1 (Perfectti *et al.*, 2009).

5.5. Relación variabilidad genética de aislados de *Colletotrichum* / Cultivar de *S. betaceum* y su distribución geográfica

Con la base de datos (Figura 10) disponible en el Grupo GENPAT (2008-2009), se realizó un mapa que reflejó la relación entre aislado caracterizado / genotipo de *S. betaceum* con la respectiva distribución geográfica de los mismos. Cada uno de los puntos de muestreo caracterizados (Anexo B) se ubicó en un mapa con el fin de conocer la distribución de los mismos. Para esto se realizaron mapas con el sistema de proyecciones cartográficas Gauss Datum Magna Sirgas mediante el programa ArcGIS 10 (ESRI 2010). La representación de la distribución de los aislados caracterizados y de los diferentes genotipos de tomate de árbol se realizó a partir de la proyección de cada uno de los puntos caracterizados.

Se realizó una prueba de Mantel para hallar la correlación entre la distancia genética y geográfica de los aislados con el fin de comprobar aislamiento por distancia, se calcularon inicialmente las respectivas matrices de distancia,

usando el programa MEGA 5.0 se calculó la matriz de distancia genética basada en la tasa de sustitución de nucleótidos. Usando el programa PASSAGE 2.0 se calculó la matriz de distancia geográfica a partir de las coordenadas X y Y. Posteriormente en el programa XLSTAT se corrió el análisis de correlación. Para determinar si existe asociación entre los aislados caracterizados, y el tipo de cultivar del hospedero de donde se obtuvieron, se realizó una prueba de Chi-cuadrado (χ^2) y un análisis Factorial de Correspondencia en el programa XLStat v. 2012.4.03.

Para determinar la correlación entre las variables geográficas (Latitud, Longitud y Altitud) y la variable de diversidad genética (diversidad nucleotídica π), con la distribución espacial de los aislados caracterizados se realizó un análisis de autocorrelación espacial basado en el Índice de Moran. El valor del índice I varía entre -1 y 1, aproximándose a cero cuando no hay una tendencia en el modelo de distribución espacial. Este hecho señala la ausencia de correlación y sugiere por lo tanto una distribución al azar. Un valor positivo de 1+ significa que la variable medida en i y en j varía en la misma dirección, indicando que valores similares tienden a ocurrir juntos (distribución agregada o agrupada). Un valor negativo de -1 apunta que la variable medida en dos puntos vecinos i y j varía en direcciones opuestas (distribución dispersa). El valor cero significa indica distribución al azar (Fortin y Dale 2005). Además del índice de Moran, la correlación espacial nos

muestra otras dos pruebas estadísticas, la puntuación Z y los valores de probabilidad o significación (p).

El valor de probabilidad o significación (p) lo establecemos en función del nivel de confianza que queremos para el análisis del índice de Moran. Estas dos pruebas nos dicen si se puede rechazar la hipótesis nula que supone que la distribución de la población es al azar. Se determinó un nivel de confianza del 99% para rechazar la hipótesis nula ($p < 0,01$). En este caso es necesario que la puntuación Z supere el valor 2,58 en el sentido positivo o negativo y que $p < 0,01$. Si los valores nos permiten rechazar esta hipótesis nula entonces se espera un patrón de agrupamiento ($I > 0$), o un patrón de dispersión ($I < 0$) (Mitchel, 2009). Todos los cálculos fueron realizados con herramientas de análisis espacial del programa ArcGIS 10.

Para generar los mapas que representan los análisis de agrupamiento y de valor atípico (I Anselin local de Moran) se utilizó la herramienta Análisis de cluster y de valor atípico de Arc GIS la cual identifica clusters espaciales de las entidades con valores altos o bajos. La herramienta también identifica los valores atípicos espaciales. Para realizar esto, la herramienta calcula un valor de I local de Moran, una puntuación z, un valor P y un código que representa el tipo de cluster para cada entidad. Las puntuaciones z y los valores P representan la significancia estadística de los valores de índice calculados.

Figura 10. Formato de base de datos de cultivos de tomate de árbol muestreados (GENPAT, 2008-2009).



Libertad y Orden
Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL - UNIVERSIDAD DE NARIÑO -
GRUPO DE INVESTIGACIÓN GENÉTICA DE PATOSISTEMAS



FORMATO DE REGISTRO CULTIVOS DE *Solanum betaceum* (cay) Sendt.

Cod.	Fecha	Propietario de cultivo	Localización			Aplicación de fungicidas	Material infectado	
			Dpto/mun:	Coor. GPS	Cuales:		si	no
			Coor. Ver.	N				
				O			Colletotrichum	
				Alt	Ultima Fum:			
Variedad cultivo		Parte de la planta		Observaciones			Responsable	
		Hoja	Tallo	Fruto				

Fuente: GENPAT, 2009

RESULTADOS

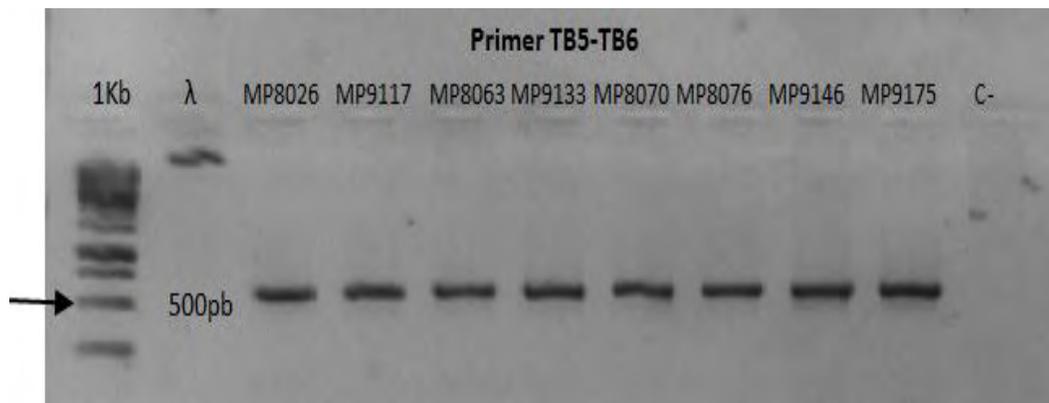
Amplificación y secuenciación de la región variable del gen de la β -tubulina 2

Mediante la técnica de PCR se amplificaron dos regiones del gen de la β -tubulina 2, usando los cebadores TB5 y TB6, se obtuvo un fragmento de 540 pb y con los cebadores TB9 y TB10 un fragmento de 490 pb aproximadamente, para los 50 aislados. Estos tamaños se establecieron por comparación con el marcador de tamaño molecular de 1kb observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %, tal como se muestra en la Figura 11 y 12.

Las secuencias revisadas y editadas se unieron generando un alineamiento global (540 pb + 490 pb) el cual se usó para realizar todos los análisis posteriores. En los resultados del BLASTn las secuencias de 49 aislados y el control V016 tuvieron mayor similitud (Tabla 5) con *C. acutatum*. Las secuencias de estos aislamientos presentaron índices de similaridad de nucleótidos de 93 a 96% respecto a las secuencias depositadas en el GenBank. Se encontró un valor de similitud del 89% entre los aislamientos MP9115 y el control V064 con *C. gloeosporioides*; además se descargaron desde el GenBank del NCBI las secuencias referencia de *C. gloeosporioides*

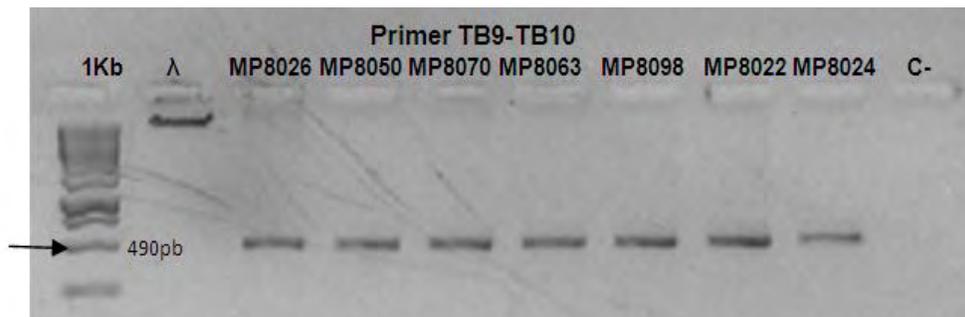
f. sp. *aeschnomene* (Código de acceso U14138.1) y como secuencia outgroup la de *N. crassa* (Código de acceso M13630.1) para construir el filograma.

Figura 11. Productos de la amplificación por PCR de la región 2 gen β -tubulina de aislamientos de *Colletotrichum* spp. usando los cebadores TB5 - TB6.



Fuente: este estudio.

Figura 12. Productos de la amplificación por PCR de la región 2 gen β -tubulina de aislamientos de *Colletotrichum* spp. usando los cebadores TB9 - TB10.



Fuente: este estudio.

Para el árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del gen de la β -tubulina 2 (Figura 13), las 50 secuencias mostraron tener una tasa de sustitución de nucleótidos que se ajusta al modelo de distancia T92+G (Tamura 3 parámetros) basado en el criterio BIC (Bayesian Information Criterion) (BIC 9766.976, lnL =4328.635). El árbol filogenético muestra a *N.crassa* en una rama independiente de todas las secuencias de *Colletotrichum*. Las secuencias de *Colletotrichum* se agruparon en una sola rama la cual se bifurca en los grupos A y B. El Grupo A (81% bootstrap) dividido en 3 subgrupos (A1–A3) representados por los aislamientos de *C. acutatum* (teleomorfo *Glomerella acutata*) cuya distribución en el filograma se soporta por valores de bootstrap superiores al 75%. El grupo B (92 % bootstrap) representado por el aislamiento MP9115 y el control V064 caracterizados como *C. gloeosporioides*.

Tabla 5. Resultados del análisis del BLASTn de las secuencias del gen de la β -tubulina 2. Fuente: este estudio.

Aislado	Descripción	Accesión	E-value	Cober tura ADN de interés	Max Iden tidad
MP8003	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
MP8004	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8013	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
MP8020	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	94%
MP8022	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	94%
MP8023	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	94%
MP8024	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8025	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
MP8026	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	94%
MP8047	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8050	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	93%	95%
MP8063	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8070	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8072	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8074	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
MP8076	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	100%	96%

Aislado	Descripción	Accesión	E-value	Cobertura ADN de interés	Max Iden tidad
MP8077	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8078	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8082	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8083	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8086	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	98%	96%
MP8088	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8094	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
MP8096	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP8097	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	94%
MP8098	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	100%	95%
MP8109	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AJ48632.1	0.0	97%	97%
MP9111	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	98%	96%
MP9112	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP9115	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschynomene</i> beta-tubulin (TUB2) gene, complete cds	U14138.1	2e-165	70%	90%
MP9117	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	95%	97%
MP9118	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	94%
MP9127	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP9133	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP9137	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
MP9146	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	98%	95%
MP9148	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
MP9150	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	94%
MP9151	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP9160	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	100%	96%
MP9168	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	94%
MP9171	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	100%	93%
MP9172	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP9175	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP9179	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
MP9184	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP9185	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP9187	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
MP9190	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
MP9192	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	96%
V016	<i>Glomerella acutata</i> CaTUB2 gene for beta-tubulin 2	AB273716.1	0.0	99%	95%
V064	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschynomene</i> gene beta-tubulin (TUB2)	U14138.1	0.0	100%	96%

En la Tabla 6 se presenta la información acerca de los aislamientos de *C. acutatum* según su origen geográfico y el tipo de cultivar de *S. betaceum* que hospeda.

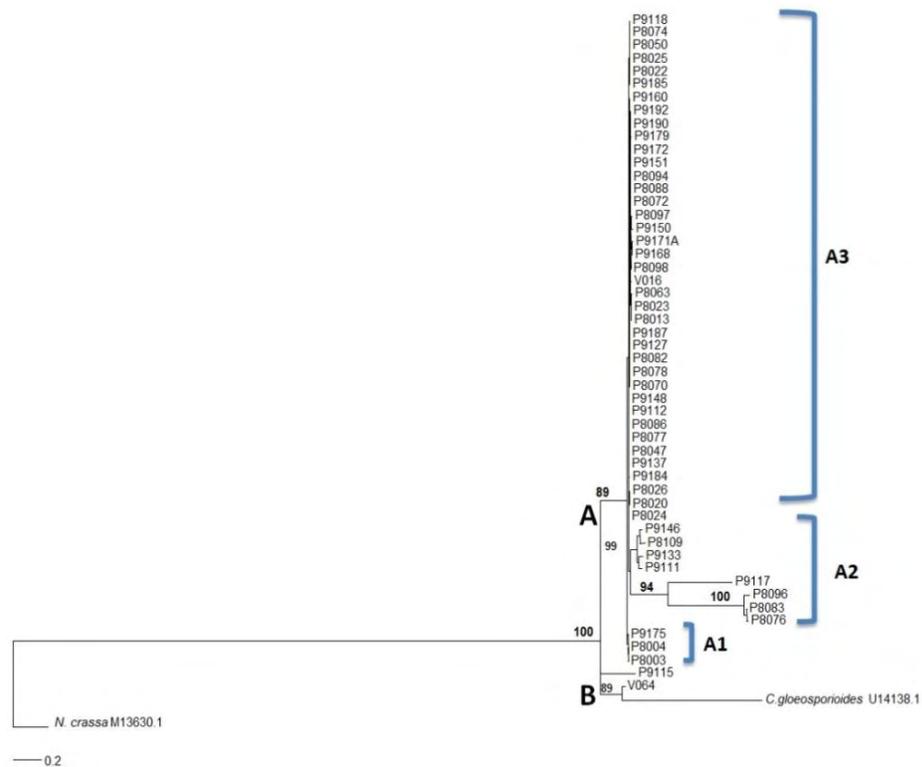
Tabla 6. Clasificación de los aislamientos de *Colletotrichum* spp, utilizados en el estudio. Fuente: este estudio.

Población	Grupo	Código Aislado	Parte de la Planta	Cultivar de <i>S. betaceum</i>	Localización Municipio
A	A1	MP9175	Fruto	Común	Sibundoy
	A1	MP8003	Fruto	Holandés	Santiago
	A1	MP8004	Hoja	Hibrido	Santiago
	A2	MP8076	Fruto	Común	Colón
	A2	MP8083	Hoja	Común	Colón
	A2	MP8096	Tallo	Común	Santiago
	A2	MP9117	Fruto	Común	San Francisco
	A2	MP8109	Fruto	Injerto	San Francisco
	A2	MP9111	Fruto	Común	Sibundoy
	A2	MP9133	Fruto	Holandés	San Francisco
	A2	MP9146	Fruto	Hibrido	Sibundoy
	A3	MP8013	Fruto	Común	Santiago
	A3	MP8020	Fruto	Común	Colón
	A3	MP8022	Fruto	Común	Colón
	A3	MP8023	Fruto	Injerto	Colón
	A3	MP8024	Fruto	Injerto	Colón
	A3	MP8025	Fruto	Injerto	Colón
	A3	MP8026	Fruto	Común	Santiago
	A3	MP8047	Hoja	Común	Santiago
	A3	MP8050	Fruto	Hibrido	Santiago
	A3	MP8063	Tallo	Común	Santiago
	A3	MP8070	Hoja	Hibrido	Colón
	A3	MP8072	Hoja	Hibrido	Colón
	A3	MP8074	Fruto	Común	Colón
	A3	MP8077	Fruto	Holandés	Santiago
	A3	MP8078	Fruto	Común	Colón
	A3	MP8082	Fruto	Común	Colón
	A3	MP8086	Fruto	Hibrido	Santiago
	A3	MP8088	Fruto	Hibrido	Santiago
	A3	MP8094	Hoja	Hibrido	Santiago
	A3	MP8097	Fruto	Holandés	Santiago
	A3	MP8098	Hoja	Común	San Francisco
	A3	MP9112	Hoja	Injerto	Sibundoy
	A3	MP9118	Tallo	Común	San Francisco
	A3	MP9127	Hoja	Hibrido	San Francisco
	A3	MP9137	Fruto	Hibrido	San Francisco
	A3	MP9148	Fruto	Común	San Francisco
	A3	MP9150	Fruto	Injerto	San Francisco
	A3	MP9151	Fruto	Hibrido	San Francisco
	A3	MP9160	Fruto	Común	San Francisco
	A3	MP9168	Fruto	Holandés	San Francisco
	A3	MP9171	Fruto	Común	Sibundoy
	A3	MP9172	Hoja	Común	Sibundoy
A3	MP9179	Fruto	Común	Sibundoy	
A3	MP9184	Fruto	Injerto	Sibundoy	
A3	MP9185	Fruto	Común	Sibundoy	
A3	MP9187	Fruto	Común	Sibundoy	
A3	MP9190	Fruto	Común	Sibundoy	
A3	MP9192	Fruto	Injerto	Sibundoy	
B	B	MP9115	Tallo	Común	San Francisco

Teniendo en cuenta que se encontró sólo un aislamiento correspondiente a *C. gloeosporioides*, el análisis filogenético y de la variabilidad genética se realizó con la población de *C. acutatum* (49 aislamientos). Se analizaron las secuencias del gen de la β -tubulina 2 que comprenden el intrón 3, 4 y 5 y los exones 4, 5 y 6, de los cuales el exón 6 fue utilizado previamente para caracterizar a *C. acutatum* con éxito en tres estudios de *Colletotrichum* spp. Talhinhos *et al.*, (2002), Vinnere *et al.*, (2002) y Lotter y Berger (2005).

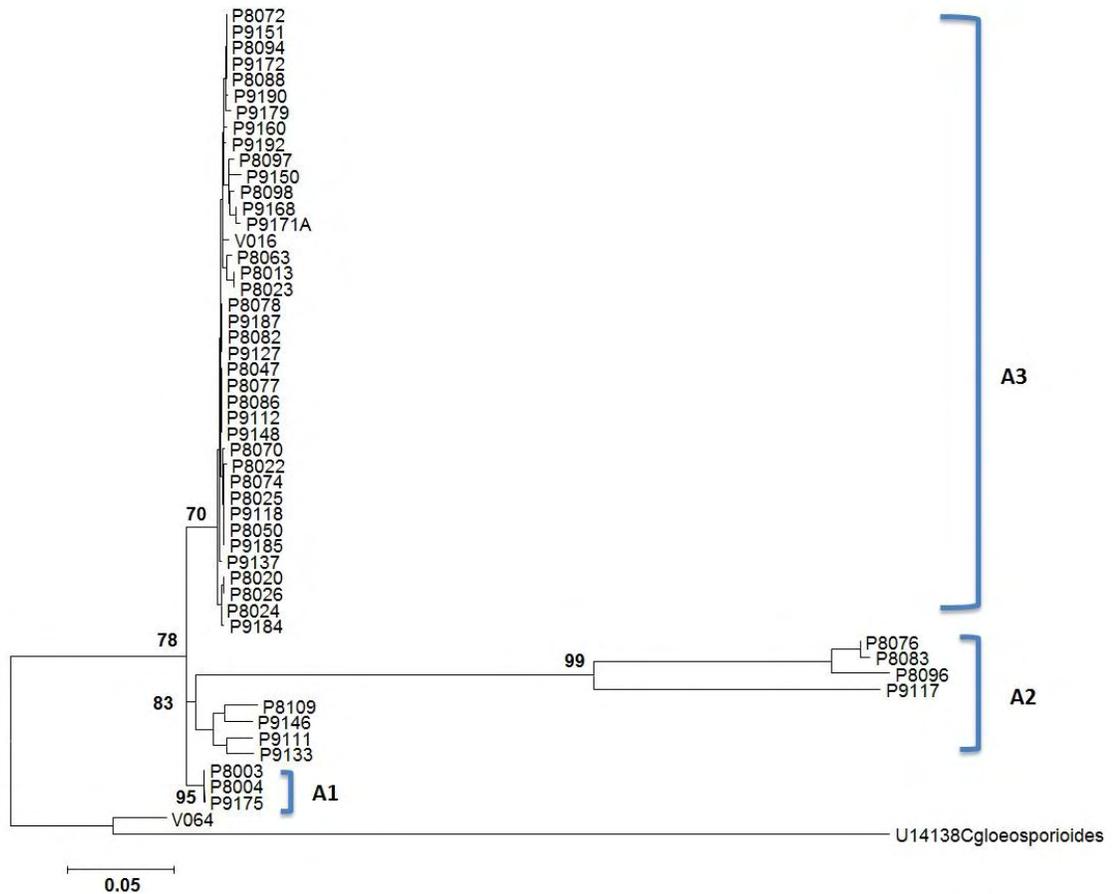
El filograma obtenido a partir de estos datos presentó un soporte del 99% de bootstrap y buena resolución, generando tres grupos dentro de la población de *C. acutatum* (Figura 14). Todas las secuencias de *C. acutatum* presentaron un alto porcentaje de identidad con las secuencias del Gen Bank, encontrándose valores desde 94% en el aislado MP9171 hasta un 97% en el aislado MP9117, y porcentajes de cobertura del ADN desde un 93 % hasta un 100%. Todas las secuencias presentaron un E-value de 0.0, lo cual indica que el alineamiento no se debe al azar y por lo tanto representa una posible homología. Como indica Lesk (2002), un E-value confiable es menor a 0.02. Un E-value entre 0.02 y 1 es posible indicativo de homología y debe analizarse con cautela, pues probablemente se deba más al azar que a un fundamento biológico particular.

Figura 13. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Máxima Verosimilitud de los datos de las secuencias del gen de la β -tubulina 2 de aislados de *Colletotrichum* spp. provenientes de *Solanum betaceum*. Los soportes de los brazos están basados en la prueba de bootstrap (1000 réplicas) y se presentan en los nodos. La barra representa 0.2 sustituciones por sitio.



Los aislados caracterizados como *C. acutatum* se analizaron como una población la cual se dividió en 3 grupos (A1-A3), tal como se observa en el filograma (Figura 14), los subgrupos están soportados por valores de bootstrap superiores al 70%. Se utilizó la secuencia de *C. gloeosporioides* (Accesión U14138) y la secuencia control V064 (*C. gloeosporioides*) como raíz del árbol.

Figura 14. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Máxima Verosimilitud de los datos de las secuencias del gen de la β -tubulina 2 de aislados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de *Solanum betaceum*. Los soportes de los brazos están basados en la prueba de bootstrap (1000 réplicas) y se presentan en los nodos. La barra representa 0.05 sustituciones por sitio.



Los resultados arrojados por el análisis de AMOVA que incluyeron las muestras de las poblaciones de *C. acutatum* indican que hay variación genética entre y dentro de ellas, ya que el valor de F_{st} fue significativo ($F_{st}=0.1317$, $P=0.00$) (Tabla 7)

Tabla 7. Resumen del análisis de la varianza molecular de las poblaciones de *Colletotrichum acutatum* evaluadas mediante la secuenciación de un fragmento del gen de la β -tubulina 2.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	% de variación
Entre Poblaciones	2	2.163	0.06930 Va	13.18
Dentro de las poblaciones	46	21.000	0.45652 Vb	86.82
Total	48	23.163	0.52582	100
Índice de Fijación			Fst=0.13179	p= 0.000

Fuente: este estudio.

La diferenciación genética entre las poblaciones de *C. acutatum* es moderada, según la interpretación de los valores de Fst: 0.05 – 0.15 establecidos por De Vicente y Fulton, 2003. La diversidad nucleotídica de la población de *C. acutatum* varía de 0 a 0.185, siendo el grupo A2 el más variable y el grupo A1 el menos variable, de la misma forma el polimorfismo nucleotídico es mayor en el grupo A2 y menor en el A3 y A1 respectivamente (Tabla 8). Al aplicar el Test de Tajima, no se incluyó a la población del grupo A1 porque el tamaño de la muestra es muy pequeño (3 aislados).

Tabla 8. Polimorfismo de ADN encontrado en la población de *C. acutatum* en el Valle de Sibundoy- Putumayo. (h = número de haplotipos, Hd = diversidad haplotípica, S = número de sitios segregantes, π = diversidad nucleotídica, θ = polimorfismo nucleotídico, D= valor D de Tajima).

Grupo	h	Hd	S	π	θ	D
A1	2	0.667	1	0.00070	0.00070	ND
A2	8	1	311	0.18509	0.13432	2,07359*
A3	21	0.946	25	0.00461	0.00648	-0,98863

Fuente: este estudio.

*:p < 0.05

ND: no determinado

Relación Aislado / Hospedero y Distribución Geográfica de *Colletotrichum*

La prueba de independencia para medir la asociación entre el tipo de cultivar del hospedero (*Solanum betaceum*) y el aislado de *Colletotrichum* caracterizado usando el estadístico Chi – cuadrado (Tabla 9), indica que las variables no tienen relación, puesto que el valor P es mayor que 0.05, se acepta la hipótesis que las variables son independientes con un nivel de confianza del 95,0%.

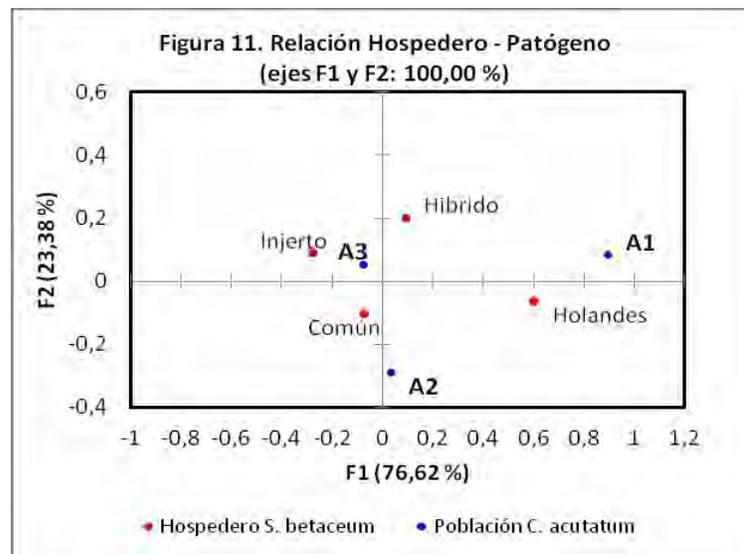
Tabla 9. Resultados de la prueba de Chi – cuadrado para medir la asociación entre el tipo de cultivar de *S. betaceum* y el aislado de *Colletotrichum acutatum* caracterizado.

Chi-cuadrado (Valor observado)	3,412
Chi-cuadrado (Valor crítico)	12,592
GDL	6
p-valor	0,756
Alfa	0,05

Fuente: este estudio.

Por lo tanto, el grupo al que pertenecen los aislados de *C. acutatum* y el tipo de cultivar de *Solanum betaceum* que hospedan no reflejan una relación directa; en la Figura 15 se representa dicha asociación, se observa que ningún grupo presenta relación con algún cultivar en específico.

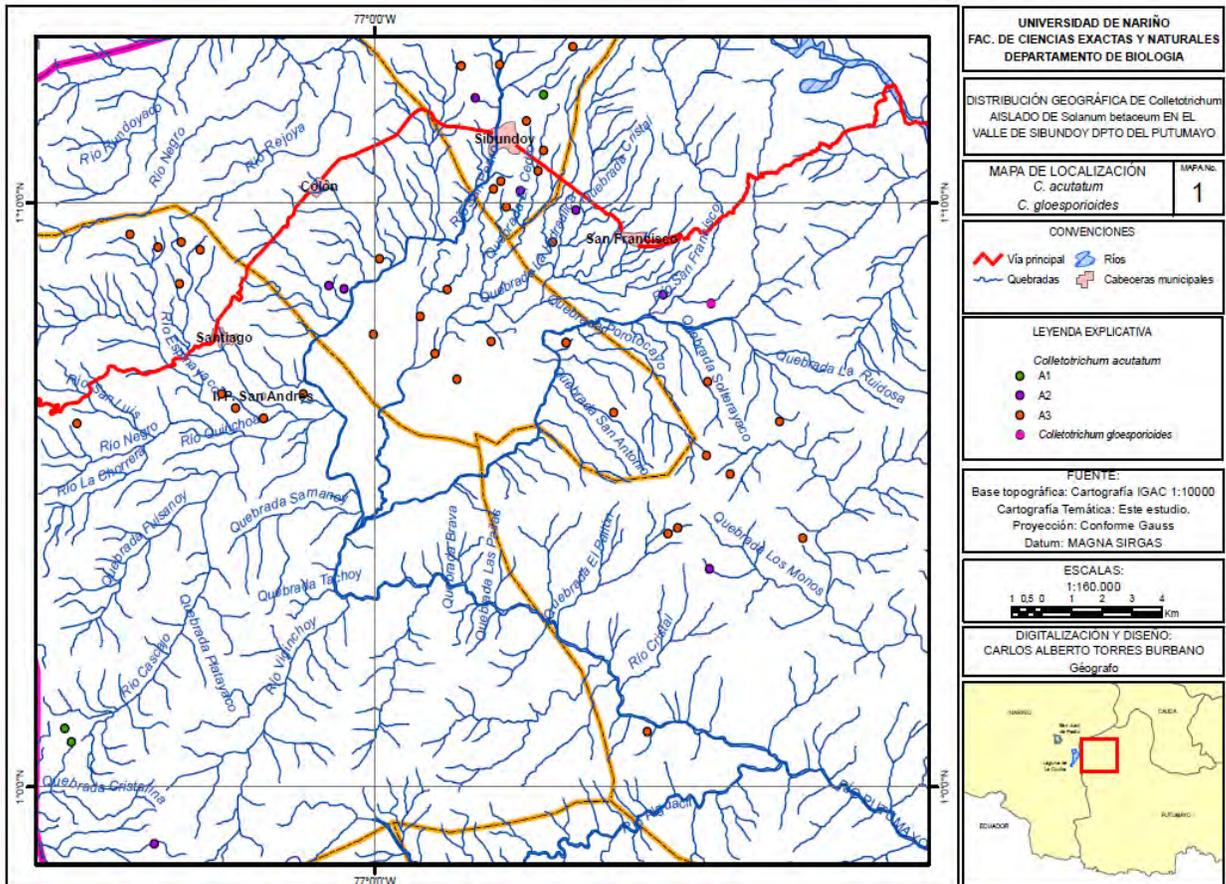
Figura 15. Gráfico simétrico entre las variables Hospedero – Patógeno mediante el Análisis Factorial de Correspondencias.



Fuente: este estudio

La distribución geográfica de los aislamientos de *C. acutatum* en el Valle de Sibundoy se presenta en la Figura 16, se puede observar que la mayoría de los puntos se encuentran distribuidos alrededor de la vía principal.

Figura 16. Puntos de distribución geográfica de los aislados de *Colletotrichum* encontrados en *S. betaceum*.

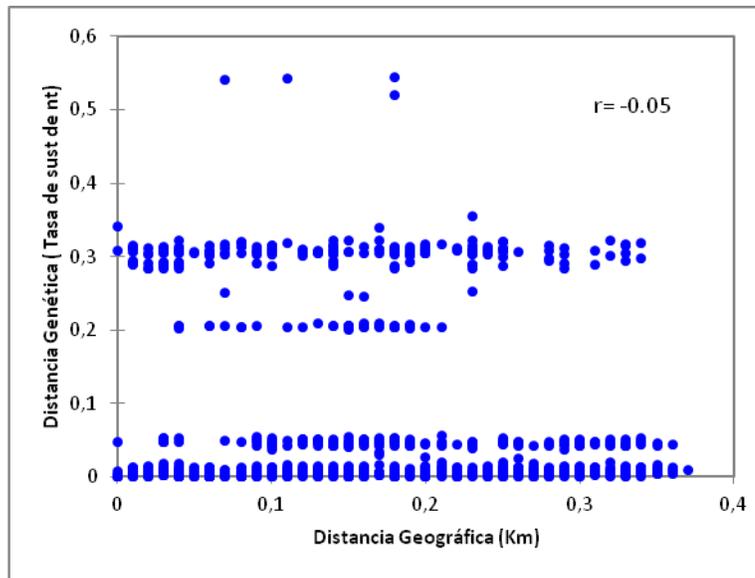


Fuente: este estudio

El valor de la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica fue de $r = -0.05$ según el coeficiente de correlación de Pearson determinado mediante el Test de Mantel (Figura 17) con un p - valor = 0.074 a un nivel de

significancia alfa de 0.05, con lo cual se establece que las dos variables no están correlacionadas.

Figura 17. Resultados del Test de Mantel para la distancia genética y la distancia geográfica entre la población de *C. acutatum* del Valle de Sibundoy – Putumayo.



Fuente: este estudio.

Distribución Geográfica de *Colletotrichum acutatum* en el Valle de Sibundoy-Putumayo

El índice de Moran obtenido para el conjunto de puntos de *C. acutatum* relacionados con las variables geográficas y genéticas se presentan en la Tabla 10. En la figura 18 está representada la distribución geográfica de la población del patógeno en el Valle de Sibundoy según la latitud, la cual

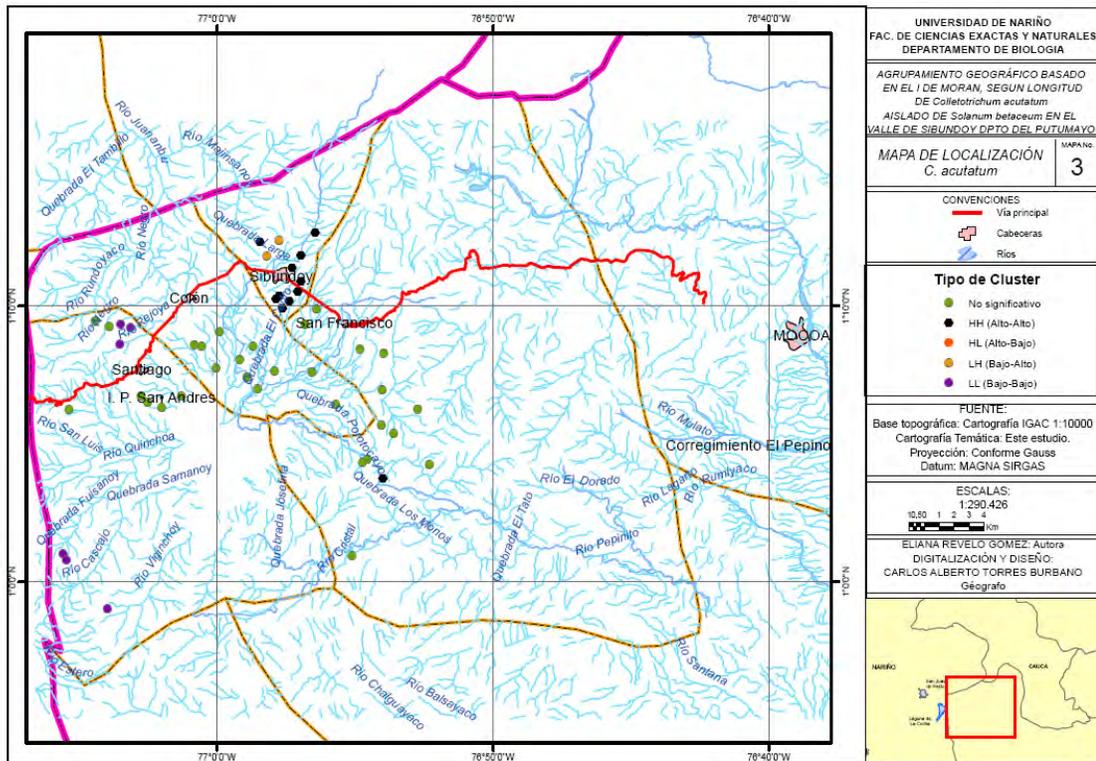
según los resultados del Índice de Moran indica que es aleatoria basada en el Análisis de cluster y de valor atípico, generado en ArcGIS 10.

Tabla 10. Resultados de los estadísticos calculados con el análisis de Autocorrelación espacial (I de Moran), para la población de *C. acutatum*.

Variable Estadístico	Latitud	Longitud	Altitud	Diversidad nucleotídica (π)
I	-0.0853	0,1853	0.0002	-0.0818
Z	-1.2988	4,0678	0.4372	-1.2352
p	0.1939	0.0000	0.6619	0.2167

Fuente: este estudio

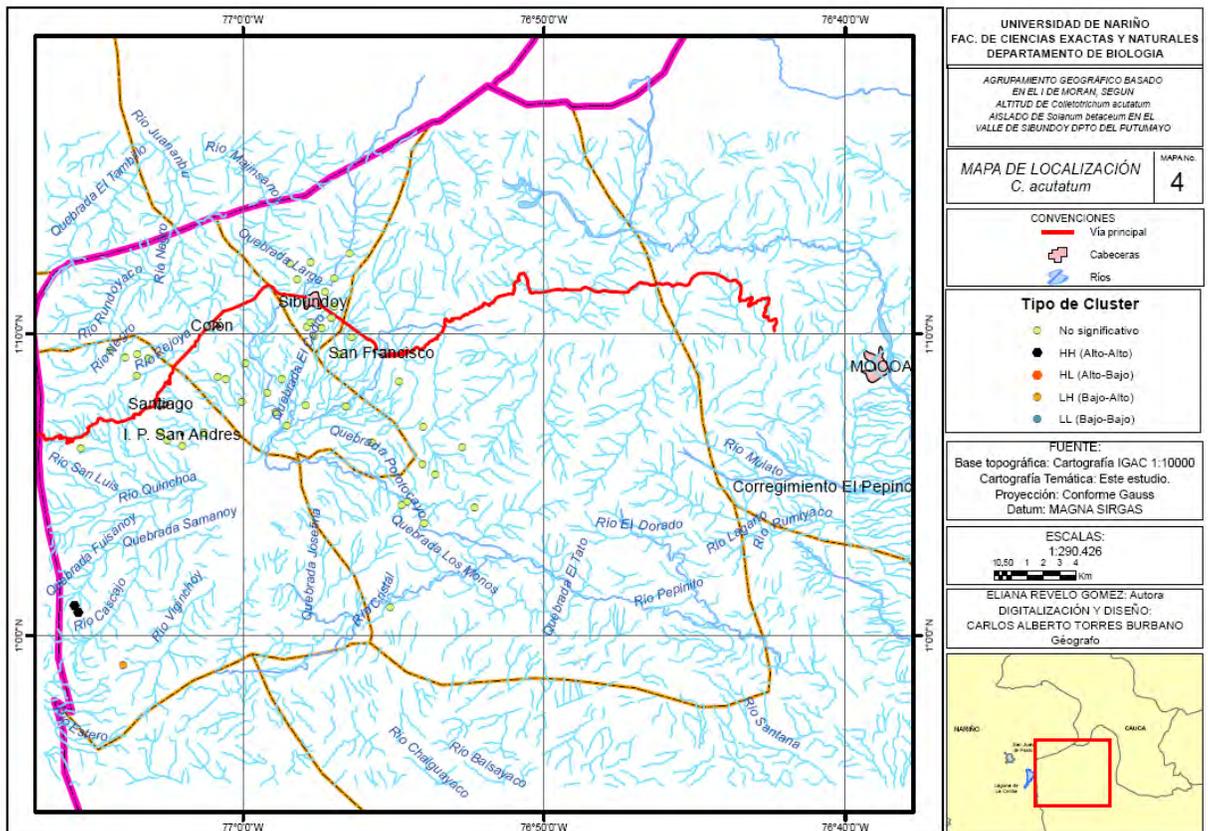
Figura 19. Mapa que refleja el agrupamiento geográfico según longitud basado en el Índice de Moran, de *Colletotrichum acutatum* aislado de *Solanum betaceum* en el Valle de Sibundoy – Putumayo.



Fuente: este estudio.

Para el conjunto de puntos de *Colletotrichum acutatum* relacionados con la Altitud del índice de Moran obtenido es mayor a 0 (Tabla 10) sin significancia estadística, lo cual indica que según esta variable el patógeno tiene una distribución aleatoria. En la Figura 20 está representada la distribución geográfica de la misma población en el Valle de Sibundoy basada en el Análisis de cluster y de valor atípico de Moran, generado en ArcGIS 10.

Figura 20. Mapa que refleja el agrupamiento geográfico según Altitud basado en el Índice de Moran, de *Colletotrichum acutatum* aislado de *Solanum betaceum* en el Valle de Sibundoy – Putumayo.

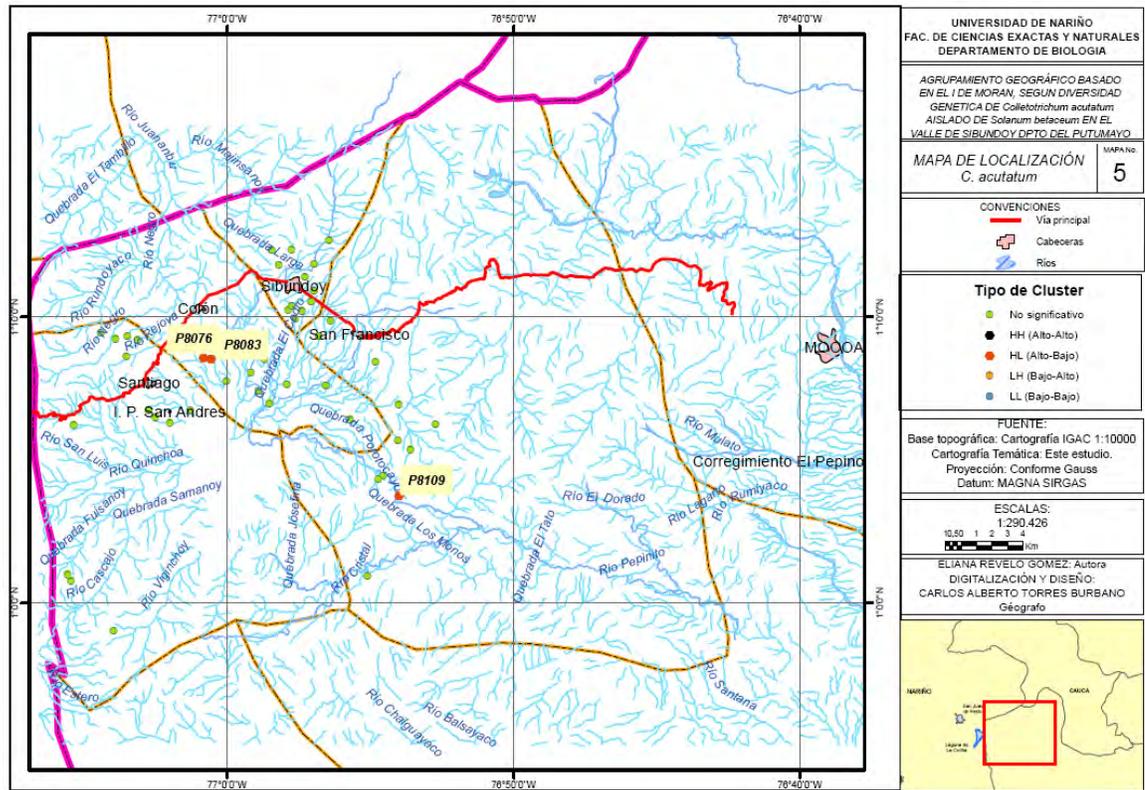


Fuente: este estudio.

Finalmente al relacionar el conjunto de puntos de *C. acutatum* con la diversidad nucleotídica (π) se encontró un $I < 0$ sin significancia estadística (Tabla 10), lo cual indica que según esta variable el patógeno tiene una distribución aleatoria. En la Figura 21 está representada la distribución

geográfica de la misma población en el Valle de Sibundoy basada en el Análisis de cluster y de valor atípico de Moran, generado en ArcGIS 10.

Figura 21. Mapa que refleja el agrupamiento geográfico basado en el Índice de Moran, según la Diversidad nucleotídica (π) de *Colletotrichum acutatum* aislado de *Solanum betaceum* en el Valle de Sibundoy – Putumayo.



Fuente: este estudio.

DISCUSIÓN

Amplificación y secuenciación de la región variable del gen de la β -tubulina 2 de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

La población de *Colletotrichum* de tomate de árbol del Valle de Sibundoy fue caracterizada mediante el análisis de secuenciación de los fragmentos de ADN de la región variable del gen de la β -tubulina 2 (tub2). Se identificaron 49 aislamientos como *C. acutatum* (teleomorfo: *Glomerella acutata*) y 1 aislado (MP9115) como *C. gloeosporioides*. En los recientes estudios de caracterización genética del patógeno causante de antracnosis en tomate de árbol en Colombia, se ha identificado principalmente a la especie *C. acutatum*. Mediante el uso de marcadores moleculares RAPDS, Portilla (2012) reporta a *C. acutatum* como el agente causal de antracnosis en tomate de árbol en los departamentos de Nariño y Putumayo. En esta misma región a través de la amplificación por PCR de regiones ITS usando los cebadores CgInt + ITS4, específico para *C. gloeosporioides* y CaInt2 + ITS4 para *C. acutatum*, Álvarez (2013) reporta a ésta especie como el patógeno causante de la enfermedad. Con el uso de marcadores ITS, Saldarriaga *et al.*, (2008), reportan también a este patógeno como agente causante de antracnosis en frutos de tomate de árbol, manzana y mora. De la misma forma, Afanador *et al.*, (2003) y Martínez *et al.*, (2009), caracterizaron aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos a partir de diferentes cultivos de frutas e

identificaron a *C. acutatum* como el agente causante de antracnosis en tomate de árbol. En los Andes Ecuatorianos mediante la secuenciación de las regiones ITS1, 5.8S, e ITS4 de los genes del ADNr, Falconí *et al.*, (2013), identificaron a *C. acutatum* como el patógeno presente en tomate de árbol.

Sin embargo, también se ha reportado a *C. gloeosporioides* como patógeno en este fruto mediante el uso de marcadores morfológicos (Rondón, 1999, Aranzazu y Rondón, 2001). Estrada y Lagos (2011) y GENPAT (2010), mediante el uso de morfometría tradicional y geométrica como herramienta para la caracterización morfológica macro y microscópica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Nariño y Putumayo; establecieron que hay una alta variabilidad morfológica en la totalidad de la población en estudio. Además, teniendo en cuenta que los organismos presentaron características macroscópicas muy variables no existe certeza de la identificación a nivel de especie pero reconocieron morfologías afines a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Estos resultados coinciden con la caracterización del aislado MP9115 como *C. gloeosporioides*, ya que según estos autores este mismo aislado se clasificó dentro de la morfología 2 (afín a *C. gloeosporioides*) descrita en su estudio.

Tradicionalmente, *C. acutatum* era diferenciado de *C. gloeosporioides* principalmente por la forma de las conidias, el color de las cepas, ocurrencia del teleomorfo y sensibilidad diferencial a benomil; sin embargo, después del

año 2004, con los trabajos realizados por Vinnere (2004), Wharton y Diéguez (2004) y OEPP/EPPO (2004), estos aspectos fueron reevaluados. Los mencionados trabajos referencian que *C. acutatum* posee una amplia diversidad genética y una gran variabilidad en sus caracteres morfológicos y fisiológicos. *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* son morfológicamente similares, con rangos de hospederos solapantes, y los aislamientos en cultivo exhiben una gran variabilidad, lo cual hace difícil separarlos por los métodos taxonómicos tradicionales. Por lo tanto, el uso de marcadores moleculares ha conducido a la reclasificación de varios aislamientos de *C. gloeosporioides* como *C. acutatum* (Rodríguez, 2007).

De acuerdo a los resultados de Estrada y Lagos (2011) y GENPAT (2010), el aislado MP9115 (usado en este estudio), presenta caracteres morfológicos afines a *C. gloeosporioides*. Sin embargo, éste mismo aislamiento en el estudio de Álvarez (2013), con la amplificación de regiones ITS usando cebadores específicos para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, se reporta como *C. acutatum*. Estos resultados permiten enfatizar en la importancia de la utilización de marcadores moleculares para definir el estado taxonómico en los hongos.

Adaskaveg y Hartin (1997) lograron diferenciar las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* mediante cebadores especie-específicos que amplifican una región ITS del RNAr usando PCR. Es por esto que en los

últimos estudios para caracterizar especies del género *Colletotrichum* se han utilizado varios genes en un mismo estudio para generar una mayor cantidad y mejor calidad de datos que permitan realizar una identificación más exacta; por ejemplo Shivas y Tan (2009), con base en los datos de la secuencia de nucleótidos de una región variable del gen *tub2*, diseñaron cebadores específicos para *C. acutatum* (TBCA-TB5) y *C. gloeosporioides* (TBCG-TB5). En su estudio identificaron más de 125 aislamientos de *Colletotrichum* spp. de olivos y otros hospederos, como *C. acutatum*.

Estos cebadores, basados en una copia única del gen *tub2* (Pannacione *et al.*, 1990), constituyen una alternativa al uso de cebadores específicos basados en ITS (Mills *et al.*, 1992, Sreenivasaprasad *et al.*, 1996 b), ya que según Lanfranco *et al.*, (1999) existe preocupación por la posibilidad de existencia de copias divergentes en los ITS, dentro de cultivos monospóricos de hongos. Por eso este autor considera que el uso de las secuencias de los genes *tub2* e *his4* para verificar los grupos filogenéticos obtenidos con ITS ayuda a superar la limitación potencial de las copias divergentes de los ITS existentes dentro de los aislados de una sola espora. Talhinhos *et al.*, 2004, concluyen que la obtención de amplicones con cebadores conservados TB5 y TB6 son muy útiles, ya que son más grandes, y producen una mejor resolución de los productos digeridos. Además, la variación relativamente baja en las secuencias de ITS, ha impedido la resolución intraespecífica en hongos (Balardin *et al.*, 1999).

Por eso al ser un sólo aislamiento no se puede asegurar con certeza que pertenezca a esta especie, para corroborar esta identificación es necesario analizar este aislado combinando los resultados de varios marcadores, entre ellos: marcadores moleculares, morfológicos y características patogénicas. Por lo tanto éste aislado sería el único diferente y estaría indicando que en el Valle de Sibundoy la antracnosis en *Solanum betaceum* está siendo causada por dos especies de *Colletotrichum*. Este fenómeno, en el cual se observa la presencia de dos especies de *Colletotrichum* en un mismo hospedero ya ha sido documentado por varios estudios.

Se han reportado numerosos casos, en los cuales varias especies de *Colletotrichum* o biotipos son asociados con un único hospedero. Por ejemplo en aguacate y mango la antracnosis es causada por *C. acutatum* y *gloeosporioides* afectando al cultivo en postcosecha principalmente (Hartill, 1992., Prior *et al.*, 1992., Prusky, 1996). Las fresas pueden ser infectadas por 3 especies de *Colletotrichum*: *C. fragarie*, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, causando antracnosis en fruto y otras partes de la planta (Howard *et al.*, 1992). Las almendras y otros frutos deciduos pueden ser infectados por *C. acutatum* o *C. gloeosporioides* (Bernstein *et al.*, 1995, Adaskaveg *et al.*, 1997). Otros hospederos que pueden ser atacados por múltiples especies de *Colletotrichum* incluyen al café, cucurbitáceas, ají y tomate de mesa (Freeman *et al.*, 1998). En los cítricos ambas especies se pueden encontrar,

pero sólo *C. acutatum* es responsable de la caída prematura de la fruta porque no coloniza tejidos muertos en el campo, mientras que *C. gloeosporioides* es un saprófito asociado (Timmer y Brown, 2000).

El análisis de la variabilidad genética de *C. acutatum* en el Valle de Sibundoy, determinó que corresponde a una sola población con una alta variación genética dentro de ella (86,82%) y en la cual se pueden diferenciar tres grupos. Mediante el análisis de las secuencias se generó un filograma (Figura 14) que refleja la composición de la población de este patógeno, en 3 grupos, de los cuales el A2 presentó una mejor resolución, ya que se dividió en 2 subgrupos los cuales probablemente responden a una tendencia por cercanía geográfica. Los aislados MP8109, MP9146, MP9111 y MP9133 se encuentran muy cerca entre sí ubicados en los municipios de Sibundoy y San Francisco, mientras que los aislados MP8076, MP8083, MP8096, MP9117 están más distantes del subgrupo anterior ubicados en los municipios de Colón y Santiago.

El análisis de polimorfismo de ADN arrojó un valor de diversidad nucleotídica (π) que varía entre 0.0070 y 0.18509, siendo el grupo A2 el que presenta mayor diversidad genética. La diversidad observada dentro de la población de *C. acutatum* puede ser asociada con la adaptación de los aislados a un amplio y no específico rango de cultivares y tipos de tejido del hospedero. Los tres grupos presentan aislados que fueron obtenidos de diferentes

cultivares, tejidos de la planta y lugares; el grupo A2 y A3 que presentan mayor variación genética (Tabla 8) comprenden organismos obtenidos de los 4 cultivares diferentes de *S. betaceum* (Común, Injerto, Holandés e Híbrido), aislados de hoja, tallo y fruto, y de los cuatro municipios del Valle de Sibundoy.

Según Afanador-Kafuri *et al.*, (2003) en un estudio de caracterización de *Colletotrichum*, aislado de granadilla y tomate de árbol en Colombia, encontraron una alta variación genética dentro de la población de *Passiflora* que reveló la presión de selección debido a que el patógeno se aisló a partir de varias especies y cultivares del hospedero. En contraste, la variación no fue observada entre los aislados de la población de tomate, originados de una región donde había un solo cultivar, sugiriendo una reciente propagación de poblaciones adaptadas a este hospedero un factor que promueve la selección clonal y la homogeneidad.

En los estudios de Portilla (2012) y Alvarez (2013), se analizó la variabilidad genética de aislados *C. acutatum* obtenidos de tomate de árbol en las regiones de Nariño y Putumayo, a partir de los datos moleculares generados mediante RAPDs mostraron que *C. acutatum* es un patógeno altamente variable genotípicamente. Determinaron en éste patógeno una alta variabilidad genética intrapoblacional con valores superiores al 90% de varianza molecular.

Según McDonald y McDermott (1993), la estructura genética de las poblaciones, es la cantidad y distribución de la variación genética que existe dentro y entre poblaciones de los patógenos, dicha estructura viene determinada por la historia evolutiva de esa población y va a ser consecuencia de las interacciones entre los 5 factores que condicionan la evolución de las poblaciones: mutación, deriva genética, flujo génico (local o a largas distancias), recombinación (sexual o asexual) y selección. *C. acutatum* a pesar de estar potencialmente limitado en su capacidad de generar variación debido a su reproducción de tipo asexual (Chaozu *et al.*, 1998). La variación dentro de las poblaciones de estos patógenos puede explicarse debido a la existencia de diferentes mecanismos de generación de variabilidad genética como los reordenamientos cromosómicos descritos por Masel y colaboradores (1990) en *C. gloeosporioides*, el desmembramiento de cromosomas más grandes y los procesos de división irregulares en *C. lindemuthianum* (Sicard *et al.*, 1997; O'Sullivan *et al.*, 1998). Otro mecanismo por el cual se genera la diversidad genética es la existencia de compatibilidad vegetativa en diferentes especies del género incluida *C. acutatum* (Katan, 2000; Wharton & Diéguez, 2004) dando origen a genotipos distintos a los precursores, debido a la generación de cariotipos diferentes o por la recombinación de caracteres (Rivera, 2007).

Diferentes estudios han demostrado que existe gran diversidad genética y heterogeneidad dentro de *C. acutatum* (Johnston y Jones, 1997; Lardner, *et al.*, 1999; Freeman, 2001), una de las hipótesis de esta diversidad descrita por Guerber y Correl (2001) quienes reportaron la recombinación sexual entre las cepas del hongo y la generación del teleomorfo *Glomerella acutata* en cultivo. Los autores determinaron que la compatibilidad vegetativa de un gran número de aislamientos de *C. acutatum* y otras especies de *Colletotrichum* es muy compleja, siendo capaces de producir un apareamiento y formar peritecios maduros en cultivo, cruces que dentro de diferentes grupos de aislamientos variaron de muy fértiles, débilmente fértiles o infértiles.

Para tratar de explicar si la variación genética encontrada en la población de *C. acutatum* del Valle de Sibundoy, responde a factores de selección se aplicó la prueba de neutralidad de Tajima, el valor D calculado con la prueba de neutralidad (Tabla 7) indica que la diversidad genética de las poblaciones de *C. acutatum* no se ajusta a una situación de evolución neutral. Por el contrario la población estaría respondiendo probablemente a variación genética causada por selección; en el grupo A2 el valor D calculado ($D = 2,07359$; $p < 0.05$) al ser positivo y significativo, según Tajima (1989) indica que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva (selección balanceadora) reflejada en un aumento de la variación genética (mayor diversidad nucleotídica y haplotípica). Mientras que el grupo A3 presenta un

valor D negativo no significativo, el cual es indicativo probablemente de un tipo de selección negativa que disminuye la diversidad nucleotídica y de haplotipos.

Teniendo en cuenta lo anterior es probable que la variabilidad genética encontrada en *C. acutatum* en la zona de estudio sea atribuida a la interacción patógeno-hospedero, como respuesta adaptativa a la presión de selección ejercida por su principal albergador *Solanum betaceum*. Según, Orozco, (2006) el hospedero, su manejo y el clima pueden tener una marcada influencia en la estructura genética de los patógenos de plantas, con frecuencia muestran una especialización patogénica con respecto a las especies y los cultivares hospederos. Estos factores aumentan la fuerza de selección ejercida sobre las poblaciones de éstos patógenos presentes en los ecosistemas favoreciendo la expresión de nuevos genes de virulencia y polimorfismos en la estructura de las poblaciones (Rivera, 2007). En los ambientes naturales y los agrícolas, ésta especialización es dinámica, ya que pueden aparecer rápidamente nuevas razas con un rango de hospederos diferentes. Además Milgroom, (1995, 1996) y Wyand *et al.*, (2003) explican que la diversidad genética encontrada entre aislamientos de *C. acutatum* puede atribuirse a una respuesta adaptativa frente a la gran diversidad de hospederos disponibles.

El Valle de Sibundoy se encuentra en el piedemonte de la cordillera andina, por lo tanto según Lobo (2001) se encuentra dentro de las áreas de ladera de la zona andina que es considerada centro primario de diversidad de *S. betaceum*, encontrándose tanto variabilidad a nivel de especies, como dentro de cada una de las taxa, considerándose genéticamente diverso y con una amplia diferenciación de variedades. Específicamente en esta región no existen variedades comerciales de *S. betaceum*, sino poblaciones locales, multiplicándose y seleccionándose por parte de los cultivadores (Lobo, 2006). El hecho que los cultivadores recurran a la siembra de semillas de plantas seleccionadas en sus propias parcelas o a partir de otras fincas o mercados locales, favorece la difusión de enfermedades y la existencia de materiales heterogéneos tanto de la planta como de los posibles fitopatógenos (Lobo, 2001).

McDonald y Linde, (2002) consideran que el grado y distribución de la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones de patógenos de las plantas proporcionan un indicador de la capacidad de adaptación de los mismos en la superación de los efectos de las tensiones tanto artificiales, como naturales de la misma; debido a que estos cambios genéticos pueden contrarrestar las medidas empleadas para controlarlos, tales como la aplicación de fungicidas y el uso de variedades genéticamente resistentes.

El uso inadecuado e intensivo de fungicidas ha contribuido a la generación de procesos de selección convergente hacia cepas de hongos resistentes y patogénicas. El estudio realizado por Burbano (2011) presenta los resultados de la evaluación de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos monospóricos de *Colletotrichum* spp. del departamento de Nariño y Putumayo, a los fungicidas (propineb, benomil, carbendazim, clorotalonil, difenoconazol y tiabendazol) y logra establecer que no existe homogeneidad en las poblaciones presentándose una gran variabilidad entre las respuestas de los aislamientos a cada uno de los fungicidas, lo cual se corrobora con lo presentado por Bailey y Jeger en 1992 quienes describen un elevado grado de variabilidad cultural, morfológica y patogénica en ensayos *in vitro* de *C. gloeosporioides* y lo asocian con la plasticidad fenotípica y capacidad de adaptación de este patógeno a diferentes condiciones.

Es importante destacar que el fungicida Benomil perteneciente al grupo de los bencimidazoles con acción sistémica, inhibe la división mitótica y ha sido ampliamente utilizado en la agricultura durante aproximadamente 30 años (Peres, 2004). En los ensayos de Burbano (2011) se logró determinar mediante análisis de AUDPC que entre los aislamientos de *Colletotrichum* se presentan respuestas similares a las diferentes concentraciones y con tendencia a la disminución de las tasas de crecimiento. Peres *et al*, (2002) en evaluaciones de este fungicida en cítricos reportan que las especies de *Colletotrichum* presentan respuestas diferenciales, encontrando que *C.*

acutatum es más resistente que *C. gloeosporioides*, corroborando los reportes de Timmer, *et al* en 1998. Las investigaciones mencionadas atribuyen los resultados encontrados al uso continuo y excesivo de este grupo de fungicidas para el control de la enfermedad, teniendo en cuenta el alto riesgo de inducción de resistencia al presentar un solo mecanismo de acción y en consecuencia la aparición de mutaciones puntuales en genes altamente conservados de la β -tubulina (Nakaune *et al*, 2007). Así, los resultados de la investigación de Burbano (2011) muestran que, la presencia de algunos aislamientos de *Colletotrichum* de Nariño y Putumayo moderadamente resistentes a los bencimidazoles indica que se debe realizar un adecuado manejo del patógeno para evitar la selección de cepas resistentes.

Teniendo en cuenta que el desarrollo de cepas del hongo más agresivas podrían ocasionar el aumento en la severidad de la enfermedad, Alvarez (2013), presenta en su estudio de caracterización patogénica de aislamientos de *Colletotrichum acutatum* aislado de tomate de árbol en Nariño y Putumayo, que no existe homogeneidad entre los aislamientos del patógeno. En esta población se presentó una gran variabilidad en su patogenicidad, debida a la plasticidad fenotípica y la capacidad de adaptación de este hongo a diferentes condiciones.

Así, la constante interacción hospedero-patógeno en la zona de estudio, ha originado la alta variación genética intrapoblacional encontrada en *C. acutatum*, lo cual evidencia la evolución del patógeno en esta región causada por factores de selección, ya que la presencia de heterogeneidad en la población de *Solanum betaceum* reflejada en los 4 diferentes cultivares que los agricultores reconocen en el Valle de Sibundoy, indica la presión de selección que el hospedero está causando sobre el patógeno, mediada indirectamente por la selección artificial que los agricultores ejercen sobre la planta; y las variaciones genéticas encontradas en los aislamientos de *C. acutatum* del Putumayo les permitirán posiblemente ser capaces de adaptarse más rápidamente a los ambientes fluctuantes.

Distribución Geográfica de *C. acutatum* en el Valle de Sibundoy – Departamento del Putumayo

La asociación de los aislamientos de *C. acutatum* y el tipo de cultivar de *S. betaceum* que hospedan no presentó una relación de dependencia, esto demuestra que los diferentes grupos de la población del patógeno caracterizados no reflejan una relación específica con el tipo de hospedero que parasitan; sino que está presente en los 4 cultivares de tomate de la región. Sin embargo teniendo en cuenta que una de las causas de la variabilidad genética del patógeno está de alguna manera relacionada con el tipo de hospedero, como una estrategia de adaptación para coexistir y

mantener la población. Es posible explicar la variación genética de los mismos, por ejemplo el grupo A2 y A3 presenta aislados de los 4 cultivares de tomate, y al relacionar este factor con la variación genética se observa que son grupos variables genéticamente. Considerando que la estructura de la población de *C. acutatum* en esta zona estaría respondiendo también a factores de selección artificial mediados por el manejo que los agricultores dan al cultivo de tomate de árbol; especialmente al uso indiscriminado de fungicidas para incrementar la producción y rendimiento de los cultivares en sus cosechas, es probable que la variación genética de estos grupos esté respondiendo de manera positiva a dicha presión de selección. Esto hace que la población de éste patógeno esté adquiriendo mayor adaptabilidad a los diferentes cultivares de tomate de árbol y probablemente desarrolle mayor agresividad, lo cual es una desventaja considerable para establecer estrategias de control de la antracnosis en la región.

La falta de correlación entre las distancias geográficas y genéticas reflejadas con los análisis de correlación de Mantel ($r < 0$) y la autocorrelación espacial con el I de Moran ($I < 0$) de los grupos de los aislados de la población de *C. acutatum* en el Valle de Sibundoy, se puede atribuir según Alzate-Marin *et al.*, (1999) a los procesos de co-evolución entre el hospedero y el patógeno debido a la constante introducción de muchas variedades del hospedero de diferentes orígenes.

En esta zona la distribución del patógeno estaría respondiendo a la distribución del hospedero, mediada principalmente por la acción antropogénica, ya que en el Valle de Sibundoy el cultivo de tomate de árbol se ha establecido principalmente en las zonas bajas cercanas a la vía de acceso principal, factor que estaría respondiendo probablemente a aspectos de comercialización del producto. El municipio de Sibundoy constituye el principal centro de acopio de las cosechas de tomate de árbol y otros frutales que se comercializan en la región, ya que posee el mercado local más grande de esta zona. En este municipio se observa la mayor diversidad de *C. acutatum*, los tres grupos de éste patógeno (A1-A3) están muy cerca entre sí; característica que podría estar relacionada con el hecho de que los cultivadores recurran a la siembra de semillas o plántulas que se comercializan en mercados locales, provenientes de las fincas de los municipios cercanos; lo cual favorece el flujo de genes y la existencia de materiales heterogéneos tanto de la planta como de los hongos.

Sin embargo, en el análisis de correlación basado en el índice de Moran, se formó un cluster tipo HL (Alto-Bajo), en el cual valores altos que presentan características similares se encuentran rodeados por valores bajos. Así, este cluster comprende los aislados: MP8109 (aislado de San Francisco), MP8076 y MP8083 (aislados de Colón) los cuales corresponden al grupo A2, es decir que, aunque la mayoría de los aislamientos no presentaron correlación entre la diversidad genética y la distancia geográfica, este cluster indica

probablemente que la distribución de los aislamientos del grupo A2 a pesar de estar en municipios diferentes comparten características genéticas similares, la cercanía geográfica entre los municipios y veredas determina que no hay diferenciación por distancia entre ellos.

Teniendo en cuenta las consideraciones de Guillot *et al.* (2009) y Riesenberg *et al.* (2009), sobre la estructura genética de las poblaciones, la cual también está determinada espacialmente, por la distribución y distancia entre ellas. La presencia de barreras antropogénicas (carreteras y áreas urbanizadas) y/o barreras naturales (condiciones climáticas, características oceanográficas, cobertura vegetal, montañas y ríos), contribuyen a una mayor o menor estructuración de las poblaciones.

Se analizó la influencia de variables geográficas como la altitud, latitud y longitud, que podrían explicar la influencia de factores geográficos en la distribución del patógeno. Así, el análisis de autocorrelación espacial basado en Altitud y Latitud no fue significativo reflejando una distribución aleatoria del patógeno. En Colombia, el tomate de árbol se encuentra cultivado entre los 1.700 y 2.400 m.s.n.m., con temperaturas promedio de 14 - 20 grados centígrados, con un ambiente de alta nubosidad, y precipitaciones comprendidas entre los 1.500 - 2.000 mm, bien distribuidos durante el año (Prohens *et al.*, 2004; Luna y Osorio, 1.993). En el Valle de Sibundoy los cultivos encontrados están distribuidos en diferentes zonas que van desde

los 1983 m.s.n.m hasta los 2350 m.s.n.m, rango óptimo para el establecimiento del frutal, sin embargo esta condición no fue determinante para correlacionar la variación genética de *C. acutatum* con factores de distribución geográfica, ya que los grupos de la población de *C. acutatum* caracterizados no responden a rangos de altitud. Por ejemplo el grupo A1 tiene aislamientos obtenidos de cultivares establecidos entre los 2091 – 2350 m.s.n.m, el grupo A2 entre 2086 – 2185 m.s.n.m, y el grupo A3 entre los 1983- 2220 m.s.n.m. Lo cual muestra que no hay un rango de alturas que corresponda a cada grupo.

Por el contrario según la Longitud se encontró una correlación espacial significativa, mostrando una distribución agrupada alrededor de las cabeceras municipales y de la vía principal, además siguiendo un patrón de distribución Occidente – Oriente se puede asociar esta distribución a la cercanía de los cultivos a la red hidrográfica de la zona. El Valle de Sibundoy hace parte de la cuenca alta del río Putumayo, la principal red hidrográfica la conforman los ríos Tamauca, Quinchoa, San Pedro y San Francisco, Putumayo y las microcuencas. En la planicie se han construido canales que recogen las aguas de algunas de las corrientes mencionadas y las conducen hasta el río Putumayo que tiene un tramo canalizado. Para los años sesenta el INCORA con el objeto de ampliar la frontera agrícola y con la expectativa de una alta fertilidad implantó en esta zona de humedales el distrito de drenaje con el proyecto “Putumayo 01” que en resumen es la construcción de

cuatro canales perimetrales cercanos a las cabeceras municipales para capturar las aguas de la montaña y el establecimiento de un sistema de drenajes secundarios y de monitoreo climático para regular un equilibrio hídrico en las diferentes épocas climáticas (EOT, 2009).

La asociación de los cultivos a la red de canales de drenaje del Valle de Sibundoy podría favorecer la propagación de la población de *C. acutatum* porque en las zonas inmediatas a los canales la humedad relativa aumenta, aspecto clave en la propagación del patógeno, ya que las bajas de temperatura y el aumento de la humedad favorecen la dispersión de este tipo de hongos. Huerta-Palacios *et al*, (2009) en un estudio sobre la influencia de las variables climáticas sobre la epidemiología de *C. gloeosporioides* en mango encontraron que, la alta humedad relativa (> 80%) que prevalece en el campo, combinado con valores bajos de temperatura durante la noche, propician la condensación de agua sobre el follaje de la planta, a tal grado que se genera escurrimiento y salpique, lo que promueve la dispersión de conidios del patógeno, aumentando la severidad de la antracnosis sobre el follaje, flores y frutos en desarrollo. Este resultado coincide con reportes previos de antracnosis en mango, que indican que el salpique de las gotas de lluvia y rocío, así como el arrastre de conidios por gotas de agua, son el principal medio de diseminación de *Colletotrichum* (Fitzell y Peak 1984; Fitzell *et al.*, 1984; Jeffries *et al.*, 1990).

CONCLUSIONES

La especie *Colletotrichum acutatum* fue caracterizada mediante la secuenciación de la región variable 2 del gen de la β – tubulina como el agente causal de antracnosis en el Valle de Sibundoy – Departamento del Putumayo. No obstante, un aislamiento de los 50 corresponde a la especie *C. gloeosporioides*.

La población de *C. acutatum* en el Valle de Sibundoy presenta una alta variabilidad intrapobacional, dentro de ella se formaron 3 grupos en los cuales se evidencia una distribución heterogénea de los 49 aislamientos.

El análisis de polimorfismo de las secuencias de los aislamientos de *C. acutatum* demostró que el grupo A2 mostró la mayor diversidad nucleotídica respecto a los grupos A3 y A1, lo cual refleja la variación genética de los mismos.

No se encontró correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica entre los aislamientos de la población de *C. acutatum* en el Valle de Sibundoy, determinando que la distribución geográfica del patógeno es aleatoria y depende de la distribución de los cultivos de *S. betaceum*, lo cual responde a factores antropogénicos y no a causas naturales.

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar los datos de otros marcadores moleculares como ITS, revisar el uso de un mayor número de regiones genómicas a ser secuenciadas y genes como: GAPDH, CHS1, ACT, HIS3. Además estos resultados deben combinarse con los marcadores moleculares, morfológicos, patogénicos y respuestas a fungicidas, que se han determinado en los estudios desarrollados dentro del grupo de Investigación GENPAT, para determinar con mayor certeza la identidad del aislado MP9115.

Se recomienda continuar este estudio ampliando el número de aislamientos, de la misma forma realizar un muestreo sistemático más amplio que abarque diferentes áreas o zonas de producción de tomate de árbol e incorpore a otros hospederos de *C. acutatum*.

Se recomienda ampliar este estudio aplicando un análisis para la identificación de mutaciones puntuales que permitan identificar en las secuencias de los aislamientos la presencia de la mutación que confiere o no resistencia a los benzimidazoles, con el fin de implementar estrategias eficaces de control de la antracnosis.

Es necesario realizar en estudios futuros sobre distribución geográfica de *C. acutatum* un muestreo, en el que se incluyan parámetros ambientales para realizar modelamientos de nicho, definir las áreas en las cuales las condiciones para la propagación del patógeno no sean favorables, y así determinar zonas más aptas para sembrar tomate de árbol.

Teniendo en cuenta que el problema más limitante para la producción del tomate de árbol en Colombia es la antracnosis causada por *C. acutatum*, especie reportada para el departamento del Putumayo, se recomienda complementar los estudios de estructura genética de estas poblaciones con otros marcadores moleculares. Además, realizar pruebas in vitro de compatibilidad vegetativa para determinar el tipo de recombinación asexual que le ha atribuido aparentemente una alta variabilidad genética, la cual posiblemente le esté permitiendo adaptarse más rápidamente a los ambientes fluctuantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abang, M.M., Winter, S., Green, K.R., Hoffmann, P., Mignouna, H.D., y Wolf, G.A. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology*, 51,63–7.

Adaskaveg, J. E., y Hartin, R. J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*. 87,979-987.

Afanador-Kafuri, L., Dror Minz, M., y Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*. 93 (5).

Alahakoon, P.W., Brown, A.E., Sreenivasaprasad, S. 1994. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiology Molecular Plant Pathology*. 44,93–103

Albornoz, G. 1992. El tomate de árbol en el Ecuador. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, 130 p.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25, 3389-3402.

Álvarez, O. S. 2013. Caracterización molecular y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp en cultivos de Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav) Sendt.). Tesis de Grado. Maestría en ciencias agrarias con énfasis en producción de cultivos. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño.

Álvarez, E., Ospina, C.A., Mejía, J.F., y Llano, G.A. 2002. Caracterización morfológica, genética y patogénica del agente causal de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana*. Volumen 28. Número 1.

Alzate-Marin, A.I., Barros, E.G. y Moreira, M.A. 1999. Co-evolution model of *Colletotrichum lindemuthianum* (Melanconiaceae, Melanconiales) races that occur in some Brazilian regions. *Genetics and Molecular Biology*. 22, 115-118.

Amrani, L., y Corio-Costet, M.F. 2006. A single nucleotide polymorphism in the B-tubulin gene distinguishing two genotypes of *Ershype necator* expressing different symptoms in grapevine. *Plant Pathology*. 55, 505-512.

Bailey, J.A., y Jeger, M.J. 1992. *Colletotrichum*, Biology, Pathology and Control. Edited by British Society for Plant Pathology.

Balardin, R.S; Smith, J.J; Kelly, J.D. 1999. Ribosomal DNA polymorphism in *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mycological Research*. 103, 841-48

Bernal, J. y Díaz, C. 2006. Materiales locales y mejorados de tomate de árbol, mora y lulo sembrados por los agricultores y cultivadores disponibles para la evaluación en Colombia. Boletín divulgativo 7. Centro de investigación La selva. Rionegro, Antioquia, Colombia

Bernstein, B., Zehr, E. I., Dean, R. A., y Shabi, E. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Disease*. 79,478-482.

Blakemore, E.J.A., Jaccoud, D.S. y Reeves, J.C. 1994. PCR for the detection of *Pyrenophora* species, *Fusarium moniliforme*, *Stenocarpella maydis*, and *Phomopsis/Diaporthe* complex. In: Schots A, Dewey FM, Oliver RP (eds) Modern assays for plant pathogenic fungi. CABI, Wallingford, pp 205–213

Bonde, M.R., Peterson, G.L., y Maas, J.L. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology*. 81,1523–1528

Braithwaite, K.S., Irwin, J.A.G., y Manners, J.M. 1990. Ribosomal DNA as a molecular taxonomic marker for the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Australian Systematic Botany*. 3,733–738

Bridge, P.D., Pearce, A., Rivera, A., y Rotherford, M. A. 1997. VNTR derived oligonucleotides as PCR primers for population studies in filamentous fungi. *Letters Applied Microbiology*. 24,426-430.

Brown, A.E., Sreenivasaprasad, S., y Timmer, L.W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*. 86,523-527.

Buddie, A.G., Martínez-Culebras, P., Bridge, P.D., García, M.D., Querol, A., Cannon, P.F., Monte, E. 1999. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. *Mycology Research*. 103,385–394

Buhr, T. L., y Dickman, M. B. 1994. Isolation, characterization, and expression of a second beta-tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied Environment Microbiology*. 60,4155- 4159.

Burns, R.G. 1991. "Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints", *Cell Motility Cytoskeleton*. Volume 20 (3): 181–189.

Burbano, R. C. 2011. Sensibilidad a seis fungicidas de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de *Solanum betaceum* en los departamentos de Nariño y Putumayo. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Universidad de Nariño.

Centro Provincial de Gestión Agroempresarial del Valle de Sibundoy. 2007. Informe de Actividades. p.2.

Chaozu, He.; Anca, G.; Rusu, Agnieszka M.; Poplawski, John A.; Irwin, G. y Manners, John M. 1998. Transfer of a supernumerary chromosome between vegetatively incompatible biotypes of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. En: Genetics Society of America. 150, 1459–1466.

Convenio MAG / IICA. 2001. Identificación de mercados y tecnología para productos agrícolas tradicionales de exportación. Subprograma de Cooperación Técnica. Quito, Ecuador.

Correll, J.C., Guerber, J.C., y Rhodes, D.D. 1994. Genetic and molecular diversity of populations of *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* on apple fruit. In: Proceedings of Fifth International Mycological Conference.

Cruz, L.P. 2003. Uso de la diversidad genética de *Beauveria bassiana* para el diseño de alternativas de control de la broca del café. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 71p.

DANE, 2008. Frutas exóticas en Colombia /Inteligencia de mercados. Exportaciones Por: Legiscomex.com

Davidse, L. C., y Flach, W. 1977. Differential binding of methylbenzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal Cell*.

De Luna, E., Guerrero, J.A., y Chew-Taracena, T. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica*. 15 (3), 351-370

De Vicente, M.C. y Fulton T. 2003. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. Illus. Nelly Giraldo. IPGRI, Rome, Italy and Institute for Genetic Diversity, Ithaca, New York, USA. ISBN: 92-9043-589-5. IPGRI and Cornell University.

Denoyes-Rothan, B., G. Guérin, C. Délye, B. Smith, D. Minz, M. Maymon y S. Freeman. 2003. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. *Phytopathology*. 93,219-228.

Doolittle, R.F. 1992. "Reconstructing history with amino acid sequences", *Protein Science*. 1 (2), 191–200.

EOT, Esquema de Ordenamiento Territorial. 2009. Alcaldía Municipal de Santiago Putumayo.

Estrada, F. A.P. y Lagos, M, L.E. 2010. Uso de morfometría tradicional y geométrica como herramienta para el análisis de la variabilidad genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) de Nariño y Putumayo. Evento: XLV Congreso de Ciencias Biológicas Ponencia. Libro: *Memorias XLV Congreso de Ciencias Biológicas*, p.1 – 166.

Excoffier, L.; Laval, G. y Schneider, S. 2006. Arlequin version 3.1. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis.

Fitzell, R.D., yPeak, C.M. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. *Annals Applied Biology*. 104,53-59.

Fitzell, R.D., Peak, C.M., y Darnell, R.E. 1984. A model for estimating infection levels of anthracnose disease of mango. *Annals Applied Biology*. 104,451-458.

Förster, H. y Adaskaveg, J.E. 1999. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. *Phytopathology*, 89:1056-1065.

Fortin, M. J. y M. Dale. 2005. Spatial Analysis. A guide for ecologists. 365 pp. United Kingdom. Cambridge University Press.

Freeman, S., Minz, D., Maymom, M. y Veibil, A. 2001. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. *Phytopathology*. 91,586-592.

Freeman, S., Shabi, E., y Katan, T. 2000. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.). *Applied Environment Microbiology*. 66,5267-5272.

Freeman, S., Katan, T., y Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *The American Phytopathological Society*. Plant Disease / Vol. 82 No. 6

Freeman, S., y Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. The American Phytopathological Society. *Phytopathology*. 87,516-521.

Freeman, S., Katan, T., y Shabi, E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Applied Environment Microbiology*. 62, 1014-1020.

Freeman, S., y Rodriguez, R. J. 1995. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. *Mycology Research*. 99,901-905.

Freeman, S., Pham, M., y Rodríguez, R.J. 1993. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Experimental Mycology*. 17,309– 322

Fujimura, M., Oeda, K., Inoue, H., y Kato, T. 1992. A single amino-acid substitution in the beta tubulin gene of *Neurospora* confers both

carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity. *Currents Genetics*. 21, 399-404.

Gaztambide, 2005. Distribución vertical y temporal de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) sobre una siembra comercial de Gandul (*Cajanus cajan* L.). Tesis. Biología. Universidad de Puerto Rico.

Geiser, D.M, Pitt, J.L, Taylor, J.W. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings National Academy Science USA*. 95,388–393.

GENPAT, Grupo de Investigación Genética y Evolución de organismos Tropicales. 2011. Antracnosis y Gota en tomate de árbol del Valle de Sibundoy. Cartilla Informativa. Convocatoria Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2008, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural- Universidad de Nariño. CONVENIO N° 054/08 MADR/CIAT.

GENPAT, Grupo de Investigación Genética y Evolución de organismos Tropicales. 2010. Caracterización morfológica del patógeno *Colletotrichum* spp. en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en el Valle de Sibundoy y Departamento de Nariño. (Sexto informe de actividades). Convocatoria Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2008, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural -Universidad de Nariño. CONVENIO N° 054/08 MADR/CIAT.

Gómez, J. 2005. El gen de la Beta Tubulina no está mutado en los estadios tempranos del carcinoma pulmonar no microcítico.

Griffith, G. y Shaw, D. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes Are Detected after PCR Amplification of DNA from Pure Cultures or from Host Lesions. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (10), 4007-4014.

Guerber, J.C., Liu, B., Correll, J.C. y Johnston, P.R. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, 95, 872–895.

Guerber, J.C., y Correll, J.C. 2001. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia*. 93, 216- 229.

Guillot, G., R. Leblois, A. Coulon y A. C. Frantz. 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology*. 18,4734-4756.

Hall, T .A. 1999. BioEdit: a user –friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41,95-98.

Hartill, W. F. T. 1992. Post-harvest rots of avocado in New Zealand and their control. Pages 1157-1162 in: Brighton Crop Prot. Conf., Brighton, UK.

- Hodson, A., Mills, P.R., Brown, A.E. 1993. Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Mycology Research*. 97,329–335
- Howard, C. M., Maas, J. L., Chandler, C. K., y Albregts, E. E. 1992. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum complex* in Florida. *Plant Disease*.76,976-981.
- Huerta-Palacios, G., Holguín-Meléndez F., Benítez-Camilo, F.A. y Toledo-Arreola, J. 2009. Epidemiología de la Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. And Sacc.] en Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Aaulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27,93-105
- Jeffries, P., Dodd, J.C., Jeger, M.J., y Plumbley, R.A. 1990.The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*. 39,343-366.
- Johnston, P.R., y Jones, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit. Rots assessed using ADNr sequences. *Mycologia*. 89, 420-430
- Jung, M. K., Wilder, I. B., y Oakley, B. R. 1992. Amino-acid alterations in the BenA (beta-tubulin) gene of *Aspergillus nidulans* that confer benomyl resistance. *Cell Motility Cytoskeleton*. 22,170-174.

Katan, T. 2000. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: Wharton, P.S. y Diéguez-Uribeondo, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. En: Anales del Jardín Botánico de Madrid. 61(1): 3-22.

Kaufman, P.J., y Weideman, G.J. 1996. Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genera. *Plant Disease*. 80,1289–1293

Koenraadt, H., Somerville, S. C., y Jones, A. L. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*. 82,1348-1354.

Kulik, T., Pszczółkowska, A., Olszewski, J., Fordon´ski, G., Płodzien´ K., y Sawicka-Sienkiewicz, E. 2005. Identification of *Colletotrichum acutatum* from yellow and andean lupin seeds using PCR assay. *Electronic Journal Policy Agronomy University*. 8(1):02.

Kuramae-Izioka, E.E., Lopes, C.R., Souza, N.L., y Machado, M.A. 1997. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. *European Journal Plant Pathology*. 103,323–329

Lanfranco, L., Delpero, M., y Bonfante, P. 1999. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology*. 8,37-45.

Lardner, R., Johnston, P.R., Plummer, K.M. y Pearson, M.N. 1999. Morphological and Molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. *Mycological Research*. 03, 275-285.

Lesk, A.M. 2002. "Introduction to Bioinformatics", Oxford University Press.

Librado, P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 25(11):1451-1452.

Little, M., y Seehaus, T. 1988, "Comparative analysis of tubulin sequences". *Comparative Biochemical Physiology*. 90 (4), 655–670.

Lobo, M. 2006. Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual. En: *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7(2): 40-54.

Lobo, M. 2001. Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt), frutal promisorio para la diversificación del agro andino. Informe. CORPOICA C.I. La Selva Rionegro Ant. Programa de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetales.

Lubbe, C.M., Denman, S., Cannon, P.F., Groenewald, J.Z., Lamprecht, S.C., y Crous, P.W. 2004. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of *Proteaceae*. *Mycologia*. 96, 1268–1279

Luna A., J. I. y Osorio, D. L. 1993. El cultivo del tomate de árbol en la provincia del Sumapaz (CUND). En: Agrodesarrollo. Vol 4 No 1 - 2. Tunja. Pag. 264-279.

MADR, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2008. Anuario de frutas y hortalizas de Colombia. Bogotá, D.C. 80 p.

Mackie, J.M., Irwin, J.A.G. 1998. Genetics and race variability of the Lucerne *Colletotrichum trifolii* pathosystem in Australia. *Australian Journal Agriculture Research*. 49,713–722

Majer, D., Mithen, R., Lewis, B.G., Vos, P., y Oliver, R.P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycology Research*. 100,1107–1111

Martín, M., y García-Figueres, F. 1999. *Colletotrichu acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal Plant Pathology*. 105,733-741.

Martínez-Culebras, P.V., Barrio, E., García, M.D., y Querol, A. 2000. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. *Microbiology Letters*. 189:97–101.

Masel, A.M., Braithwaite, K.S., Irwin, J. G. A., y Manners, J.M. 1990. Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Current Genetics*. 18, 81-6.

Mcdonald, B. A., y Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. En: *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379.

McDonald, B. A., y Mc. Dermott, J.M. 1993. The population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*. 43,311-319.

Meijer, G., Megnegneau, B., Linders, E.G.A. 1994. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. *Mycology Research*. 98,267–276

Milgroom, M. G. 1996. Recombinations and the multilocus structure of fungal populations. En: *Annual Review of Phytopathology* 34: 457-477.

Milgroom, M. G. 1995. Analysis of population structure in fungal plant pathogens. Pp. 213-229. En: *Disease analysis through genetics and molecular biology: Interdisciplinary bridges to improved sorghum and millet crops*. Leslie, J. F. & Frederiksen, R. A. En: Iowa State University press/Ames.

- Mills, P.R., Sreenivasaprasad, S., y Brown, A.E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *Microbiology Letters*. 98, 137–144
- Mitchell, A. 2009. The ESRI guide to GIS analysis. Volume 2: Spatial measurements & Statistics. 238 pp. California (USA). ESRI Press.
- Moriwaki, J., Tsukiboshi, T., y Sato, T. 2002. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. *Journal Genetic Plant Pathology*. 68,307–320
- Morton, J. 1999. Tomate de árbol. Frutas de climas calientes. Miami, FL.p. 437-440.
- Munaut, F., Hamaide, N., Maraite, H. 2002. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. *Mycology Research*. 106, 579–593
- Nakaune, R., Nakano, M. 2007. Grape and Persimmon Research Station, National Institute of Fruit Tree Science, National Agricultural and Food Research Organization.
- O’Sullivan, Donal; Tosi, Paola; Creusot, Francine; Cooke, Mike; Phan, Thi Hai; Dron, Michel y Langin Thierry. 1998. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. En: *Current Genetics*. 33, 291-298.

O'Donnel, K., Cigelnik, E., y Nirenberg, H. 1998. Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikori* species complex. *Mycologia*. 90 (3). 465-493.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke B.K., Casper, H.H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(14),7905-10.

O'Neill, N.R., van Berkum, P., Lin, J-J., Kuo, J., Ude, G.N., Kenworthy, W., y Saunders, J. A. 1997. Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology*. 87,745-750

OEPP/EPPO. 2004. *Glomerella acutata*. Diagnostic protocols for regulated pests. Boletín 34, 193 -199.

OPCION PUTUMAYO. 2007. Valle de Sibundoy. Disponible en Internet, URL:<http://personales.com/colombia/cali/ONGFOP/valle.htm>

Orbach, M. J., Porro, E. B., y Yanofsky, C. 1986. Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Molecular Cell Biology*. 6,2452-2461.

Orozco, S. M. 2006. Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de *Colletotrichum acutatum* Simmonds de cítricos en México. Doctorado en Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima.

Panaccione, D. G., y Hanau, R. M. 1990. Characterization of two divergent beta-tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. *Gene*. 86,63- 170.

Patiño, C., Sánchez, R., y Afanador- Kafuri, L. 2007. Selección y regeneración in Vitro de somaclones de tomate de árbol (*Solanum betacea* cav. Sendt) utilizando filtrados de cultivo de *Colletotrichum acutatum* con actividad pectinasa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 60 (2), 3923-3937.

PDM, Plan de Desarrollo Municipal 2012- 2015. 2012. Alcaldía Municipal de Santiago Putumayo – Colombia.

Perfectti, F.X. Picó, J.M. Gómez. 2009. La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas* 18 (1): 10-16.

Peres, N. A. R., Souza, N. L., Peever, T. L., y Timmer, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*. 88,125-130.

Pérez de A, M., Arnal, E., Soto, E., y Aponte, A. 2006. El clima y su relación con las principales plagas y enfermedades del tomate de árbol en el Jarillo, Estado Miranda, Venezuela. CENIAP HOY. Número 11.

Photita, W., Taylor, P.W.J., Ford, R., Hyde, K.D., y Lumyong, S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*. 18,117–133

Pickersgill, B. 2007. Domestication of plants in the Americas: Insights from mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany*. 100, 925-940.

Portilla, B. E. 2012. Variabilidad genotípica de las poblaciones de *Colletotrichum acutatum* procedentes de cultivos de *Solanum betaceum* mediante el marcador molecular RAPD. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Universidad de Nariño.

Prior, C., Elango, F., y Whitewell, A. 1992. Chemical control of *Colletotrichum* infection in mangoes. Pages 326-336 in: *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control. J. A. Bailey and M. J. Jeger, eds. CAB Int., Wallingford, UK.

Prohens, A., A. Rodriguez-Burruezo y F. Nuez. 2004. Breeding Andean solanaceae fruit crops for adaptation to subtropical climates. *Acta Horticultural*. Nº 662

Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 34, 413-434.

Prusky, D., y Plumbley, R. A. 1992. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruit. En: Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, pages 337-357. CAB International. Wallingford UK.

Rehner, S.A., y Uecker, F.A. 1994. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycetes *Phomopsis*. *Canadian Journal Botany*. 72, 1666–1674

Riccioni, L., Conca, G., y Pucci, N. 2003. Identification by PCR-RFLP of *Phomopsis/Diaporthe* species on Italian soybean seeds. In: 8th International Congress of Plant Pathology (ICPP 2003), Christchurch, New Zealand, abstract no. 1076

Rivera, C. G. 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología. Impreso en Costa Rica. 308 p.

Rodríguez, A. 2007. Caracterización molecular de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana.

Rondón, J.G; Aranzazu, L.F; Tamayo, P., Bonett, J.G. 1999. Estudio biológico y epidemiológico de la antracnosis (*Colletotrichum*

gloeosporioides, Penz), del tomate de árbol (*Solanum betacea*, (Cav) Sendt), y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia. Informe Técnico Final. Convenio Pronatta-Corpoica.

Rosenberg, M.S., y C.D. Anderson. 2011. PASSaGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics and Geographic Exegesis. Version 2. *Methods in Ecology and Evolution*. 2(3),229-232.

Saha, T., Kumar, A., Ravindran, M., Jacob, C.K., Roy, B., y Nazeer, M.A. 2002. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. *Mycology Research*. 106,215–221.

Sherriff, C., Whelan, M.J, Arnold, G.M., Lafay, J.F., Brygoo, Y., y Bailey, J.A. 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology*. 18, 121–138.

Shivas, R.G. y Tan, Y.P. 2009. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. *Fungal Diversity*. 39, 111-122.

Sicard, D.; Michalakis, Y.; Dron, M. y Neema C. 1997. Genetic Diversity and Pathogenic Variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the Three Centers of Diversity of Its Host, *Phaseolus vulgaris*. En: *Phytopathology*. 87, 807-813.

Souza Paccola, E. A.; Fávoro, L. C. L.; Casela, C. R. y Paccola Meirelles, L. D. 2003. Genetic Recombination in *Colletotrichum sublineolum*. En: *Journal of Phytopathology* .151 (6), 329-334.

Sreenivasaprasad, S., y Talhinhos, P. 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology*.

Sreenivasaprasad, S., K. Sharada, A. E. Brown, y P. R. Mills. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*. 45,650–655.

Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R., Meehan, B. M., y Brown, A. E. 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*. 39,499-512.

Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E., y Mills, P. R. 1992. DNA sequence and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiology Molecular Plant Pathology*. 41,265-281.

Sung Kee Hong, Wan Gyu Kim, Hae Keun Yun y Kyung Jin Choi. 2008. Morphological Variations, Genetic Diversity and Pathogenicity of *Colletotrichum* species Causing Grape Ripe Rot in Korea. *The Journal Plant Pathology*. 24(3), 269-278.

Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. Pages 1-26 in: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey and M. J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, UK.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123(3),585-595

Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J.g, y Oliveira, H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of Lupins. *The American Phytopathological Society*. P-2002-0717-02R.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., y Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*(In Press).

Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S. and Fisher, M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 31,21-32.

Than, P.P., Shivas, R.G., Jeewon, R., Pongsupasamit, S., Marney, T.S., Taylor, P.W.J. y Hyde, K.D. 2008. Epitypification and phylogeny of *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. *Fungal Diversity*. 28, 97-108.

Thaung, M. 2008. Coelomycete systematics with special reference to *Colletotrichum*. *Mycoscience*. 49,345–350.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22,4673-4680.

Timmer, L.W. y Brown, G.E. 2000. Biology and control de anthracnose diseases of citrus. In: Prusky, D., Freeman, S., and Dickman M.B. (eds) *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host Pathogen Interaction*.

Trigiano, R.N., Caetano-Anolles, G., Bassam, B., Windham, M.T. 1995. DNA amplification fingerprinting provides evidence that *Discula destructiva*, the cause of dogwood anthracnose in North America, is an introduced pathogen. *Mycologia*. 87,490–500

Uddin, W., Stevenson, K.L., Pardo-Schultheiss, R.A., y Rehner, S.A. 1998. Pathogenic and molecular characterization of three *Phomopsis* isolates from peach, plum and Asian pear. *Plant Disease*. 82,732–737

UMATA, 2003. Evaluación municipal de costos de producción. Cultivos permanentes y semipermanentes. Secretaria de Agricultura. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural- República de Colombia. Santiago, Putumayo.

Vaillancourt L.J, Hanau, R.M. 1992. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. *Experimental Mycology*. 16,219–229

Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T., y Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Phythium* and *Phytophthora* species based on ITS ADNr, cytochrome oxidase II and B- tubulina gene sequences. *Mycologia*. 98(3), 410-422.

Vinnere, O. 2004. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Acta Universitatis Upsalensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, vol 917. Uppsala University, Uppsala

Von Arx, J.A. 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. *Journal of Phytopathology*. 29, 413.

Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18,7213–7218

Wharton, P., y Diéguez – Uribeondo, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del jardín botánico de Madrid*. 61 (1), 3-22.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification y direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Genetics and Evolution*. Part three.

Whitelaw-Weckert, M. A., Curtin S. J., Huang R. C., Steel C. L. Blanchard y P. E. Roffey. 2007. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathology*.56, 448–463

William, S, J.G.K., Kubelick, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18,6531–6535

Wyand, R. A., y Brown, J. K. M. 2003. Genetic and forma specialist diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution. En: *Molecular Plant Pathology* 4: 187-198.

Yang, H.A., Sweetingham, M.W. 1998. The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupin anthracnose. *Australian Journal of Agricultural Research*. 49,1213–1223

Yarden, O., y Katan, T. 1993. Mutations leading to substitutions at amino acid 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomil resistant phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 83,1478-1483.

Zhang, A.W., Hartman, G.L., Riccioni, L., Chen, W.D., Ma, R.Z., y Pedersen, W.L. 1997. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis*

longicolla from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. *Plant Disease*. 81,1143–1149

Zulfiqar, M., Brlansky, R.H. y Timmer, L.W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia*. 88,121-128.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo de Extracción de ADN (Griffith y Shaw, 1998) con modificaciones

- Adicionar 800 μ L de buffer de extracción CTAB (NaCl 100 mM, 20 mM EDTA, 100 Mm Tris HCl pH 8,0, NaCl 1,4 mM, CTAB 2%) a 0,5 g de micelio seco macerado mezclándolos en un agitador tipo vortéx, y 0,5 uL de Proteinasa K.
- Incubarlos tubos a 60°C por una hora.
- Adición a los tubos de 600 μ L de cloroformo.
- Centrifugar a 17000 x g por 10 min.
- Transferir 600 μ L del sobrenadante a otro tubo Ependorf de 1,5 ml, al cual se le adiciona 360 μ L de isopropanol.
- Mezclar en vortex.
- Dejar a temperatura ambiente durante 5 min.
- Centrifugar a 17000 x g por 10 min.
- Decantar el tubo recuperando el pellet.
- Lavar el pellet de DNA con 1 ml de etanol al 70% (vol/vol).
- Mezclar en vortex.
- Incubar los tubos a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Centrifugar a 17000 x g por 10 min.
- Dejar secar el pellet a 37° C por 30 min.

- Añadir 5 μ L de RNAsa, incubar a 37 °C durante 20 horas.
- Resuspender en 100 μ L Agua Ultrapura HPLC.
- Almacenar los tubos a -20°C.

ANEXO B

Datos de la ubicación geográfica de los aislados de *Colletotrichum* en el Valle de Sibundoy

Grupo	Aislado evaluado	Latitud	Longitud	Altitud m.s.n.m.
A1	MP9175	1,1846	-76,9241	2091
A1	MP8003	1,2072	-77,1706	2349
A1	MP8004	1,2672	-77,2058	2310
A2	MP8076	1,2369	-77,0922	2148
A2	MP8083	1,2025	-77,1106	2110
A2	MP8096	1,1292	-77,2158	2091
A2	MP9117	1,3003	-77,1308	2185
A2	MP8109	1,2975	-76,9002	2115
A2	MP9111	1,3936	-77,1756	2092
A2	MP9133	1,1713	-76,9363	2094
A2	MP9146	1,1749	-76,9352	2086
A3	MP8013	1,2578	-76,9863	2116
A3	MP8020	1,1836	-76,9765	2107
A3	MP8022	1,1836	-76,9729	2093
A3	MP8023	1,1835	-76,9730	2094
A3	MP8024	1,1835	-76,9730	2094
A3	MP8025	1,1835	-76,9730	2094
A3	MP8026	1,1218	-77,0050	2011
A3	MP8047	1,3475	-77,1642	2149
A3	MP8050	1,3475	-77,0914	2149
A3	MP8063	1,2272	-77,1172	2150
A3	MP8070	1,2722	-77,0925	2220
A3	MP8072	1,2722	-77,0925	2220
A3	MP8074	1,2168	-77,0653	2167
A3	MP8077	1,2367	-77,1847	2087
A3	MP8078	1,2450	-77,2164	2090
A3	MP8082	1,4519	-77,1008	2107
A3	MP8086	1,3803	-77,2133	2085
A3	MP8088	1,2594	-77,1664	2105
A3	MP8094	1,1493	-76,9959	2088
A3	MP8097	1,2492	-77,2392	1983
A3	MP8098	1,2414	-77,0594	2148

Grupo	Aislado evaluado	Latitud	Longitud	Altitud m.s.n.m.
A3	MP9112	1,3936	-77,1756	2089
A3	MP9118	1,3003	-77,1308	2185
A3	MP9127	1,1524	-76,9593	2087
A3	MP9137	1,2611	-77,0500	2084
A3	MP9148	1,1575	-76,9291	2085
A3	MP9150	1,1606	-76,9379	2095
A3	MP9151	1,1575	-76,9291	2089
A3	MP9160	1,1367	-76,9388	2090
A3	MP9168	1,1478	-76,9210	2110
A3	MP9171	1,1803	-76,9281	2107
A3	MP9172	1,1771	-76,9144	2105
A3	MP9179	1,2128	-76,9253	2151
A3	MP9184	1,2001	-76,9126	2125
A3	MP9185	1,1881	-76,9364	2096
A3	MP9187	1,1995	-76,9106	2142
A3	MP9190	1,2122	-76,9190	2218
A3	MP9192	1,1896	-76,9286	2100
B	MP9115	1,2961	-77,0586	2120