

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PATOGENICA DE *Colletotrichum* spp. EN
CULTIVOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt)**

SANDRA LORENA ALVAREZ ORDOÑEZ

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS CON ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE CULTIVOS
SAN JUAN DE PASTO
2013**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PATOGENICA DE *Colletotrichum* spp. EN
CULTIVOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt)**

SANDRA LORENA ALVAREZ ORDOÑEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Magíster en Ciencias Agrarias con Énfasis en Producción de Cultivos**

DIRECTORA:

LUZ ESTELA LAGOS MORA M. Sc.

COORDIRECTOR:

OSCAR EDUARDO CHECA CORAL Ph.D

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS CON ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE CULTIVOS
SAN JUAN DE PASTO
2013**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

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

Artículo 1^o del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Carlos Arturo Betancourth García
Jurado

Tulio Cesar Lagos Burbano
Jurado

Alegría Saldarriaga Cardona
Jurado

Luz Estela Lagos Mora
Presidente

Oscar Eduardo Checa Coral
Presidente

San Juan de Pasto, Marzo de 2013

AGRADECIMIENTOS

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

A mis directores de trabajo de grado Luz Estela Lagos Mora y Oscar Eduardo Checa Coral por sus enseñanzas, orientación, interés, paciencia, confianza y amistad.

A Carlos Betancourth, Tulio Cesar Lagos y Alegría Saldarriaga, jurados de este trabajo, por su apoyo, recomendaciones y orientación.

A los profesores Oscar Burbano y Hernán García por sus aportes a este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a mis profesores de la Maestría por su contribución a mi formación académica y personal.

A mis compañeros del Grupo Genética y Evolución de Organismos Tropicales GENPAT Ana Estrada, Elizabeth Portilla, Derly Andrade, Diana Burbano, Pauline Bastidas, Carolina Obando, Carolina Burbano, Gabriela Dorado, Eliana Revelo y Verónica Rodríguez por sus aportes, solidaridad y apoyo durante la ejecución de este trabajo.

A mis compañeros de la maestría Olga Lucía Benavides, Jenny Castro, William Díaz, Bayardo Yépez, Francisco Alpala, Jorge Castro, Noé Albán, Jaro Angulo, Ever Caicedo y Luis Fernando Moreno por su apoyo y amistad.

A los productores de tomate de árbol de los departamentos de Nariño y Putumayo quienes nos brindaron siempre su apoyo.

A mi familia por su apoyo incondicional, cariño y comprensión.

DEDICATORIA

A Dios por darnos la oportunidad de soñar y de creer en los sueños.

A Jairo y Valentina, los dos amores más grandes de mi vida, fuentes de esperanza, inspiración y amor, quienes me enseñaron que aunque la vida no es fácil vale la pena vivirla.

A mi mamá, ejemplo de lucha, entrega, amor y amistad; quien me enseñó que sin importar las dificultades, si le pones el corazón a lo que haces siempre triunfarás.

A mi abuelita por su sabiduría, sus cuidados, amor y ternura; quien creyó en mí y siempre estuvo a mi lado brindándome su cariño y lo mejor de sí para que pudiera alcanzar mis sueños.

RESUMEN

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp, es la enfermedad más importante de las que afectan la fruticultura a nivel mundial y nacional, debido a la severidad de los daños que ocasiona, la magnitud de las pérdidas generadas tanto en producción como en calidad de la cosecha y la dificultad que se presenta para su control. La demanda de alternativas para su manejo ha creado la necesidad de realizar estudios básicos orientados hacia el diagnóstico y caracterización del patógeno porque la identificación correcta de un organismo permite conocer los patrones de comportamiento de la especie o del grupo taxonómico y facilita el desarrollo de alternativas tecnológicas para la estructuración de planes de manejo de la enfermedad. En este trabajo se realizó la caracterización molecular y patogénica de *Colletotrichum* spp. en cultivos de tomate de árbol del Valle de Sibundoy (Putumayo) y del departamento de Nariño, mediante el análisis de la región ITS (Internal Transcribed Spacer), la aplicación del marcador RAPD y la evaluación del grado de reacción de frutos de algunos genotipos seleccionados de *Cyphomandra betacea* contra aislamientos representativos de las poblaciones de *Colletotrichum* spp. Se encontró que la especie de *Colletotrichum* que ataca los cultivos de tomate de árbol en los dos departamentos es *Colletotrichum acutatum*, y que ésta presenta un elevado porcentaje de polimorfismo, determinándose que ningún aislamiento de los evaluados es genéticamente idéntico a otro. El análisis de diversidad genética a partir de los datos moleculares muestran que *C. acutatum* es un patógeno altamente variable genotípicamente. Mediante una AMOVA se determinó que el 95.77% de la diversidad genética se atribuye a la variación dentro de las dos poblaciones estudiadas en comparación con el 4.23% de variación entre las dos regiones de estudio (Nariño y Putumayo). En cuanto al análisis de patogenicidad, se observó ninguna diferencia en el grado de reacción de los genotipos en los dos estados fenológicos evaluados frente a la infección y se estableció que los aislamientos más agresivos son los provenientes del municipio de Santiago (Putumayo) y los menos agresivos los de Sibundoy (Putumayo) y Buesaco (Nariño).

ABSTRACT

The Anthracnose caused by *Colletotrichum* spp, is the most important diseases of the ones that affect the fruit growing on a worldwide and national basis, due to the severity of the damages that it causes, the magnitude of the losses generated in production as in the crop and the difficulty that is presented for its control. The demand of alternatives for its management has created the need to carry out basic studies oriented towards the diagnosis and characterization of the pathogen because the correct identification of an organism permits to know the patterns of behavior of the species or of the taxonomical group and facilitates the development of technological alternatives for plans structuring management of the illness. In this work the molecular characterization and pathogenic of *Colletotrichum* spp. was carried out in tree tomato cultivations in the Valley of Sibundoy (Putumayo) and in the department of Nariño, by means of the analysis of the region ITS (Internal Transcribed Spacer), the application of the indicator RAPD and the evaluation of the fruits reaction degree of some genotypes selected of *Cyphomandra betacea* against representative isolations of the populations of *Colletotrichum* spp. It was found that the species of *Colletotrichum* that attacks the tree tomato cultivations in the two departments is *Colletotrichum acutatum*, and that this presents a high percentage of polymorphism, being determined that no isolation of the evaluated items is genetically identical to the other. The analysis of genetic diversity from the molecular data they show that *C. acutatum* is a highly variable pathogen genotypically. By means of an AMOVA was determined that the 95,77% of the genetic diversity is attributed to the variation inside the two populations studied in comparison with the 4,23% of variation between the two regions of study (Nariño and Putumayo). As for the analysis of pathogenicity, there was not any difference in the degree of reaction of the genotypes in the two states was observed phenological evaluated set against the infection and was established that the most aggressive isolations are the ones originated in the municipality of Santiago (Putumayo) and the less aggressive those of Sibundoy (Putumayo) and Buesaco (Nariño).

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. TITULO.....	20
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MARCO TEÓRICO	22
3.1 TOMATE DE ÁRBOL (<i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendt)	22
3.2.1 Clasificación taxonómica de <i>Colletotrichum</i>	25
3.2.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz. & Sacc.) (1884).....	26
3.2.2.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> asociado a antracnosis de tomate de árbol.....	26
3.2.3 <i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds ex Simmonds (1968).	27
3.3 ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL.....	28
3.4 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	32
3.4.1 Espaciadores de transcripción interna (Internally Transcribed Spacers ITS	33
3.4.2 Fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPDs).....	34
3.4.2.1 Principio de la técnica de RAPD.	34
3.5 ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE INVESTIGACIÓN	35
4. DISEÑO METODOLÓGICO	39
4.1 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS.....	39
4.2 ESTUDIO MOLECULAR.....	39
4.2.1 Extracción de ADN.....	39
4.2.2 Amplificación de la región ITS.	41
4.2.3 Análisis de variabilidad genética mediante marcadores RAPDs.....	42
4.2.3.1 Análisis de datos.	44
4.3 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.....	46
4.3.1 Selección de genotipos.	46
4.3.2 Selección y reactivación de aislamientos.....	46
4.3.3 Inoculación de genotipos.	48
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
5.1 ESTUDIO MOLECULAR.....	51
5.1.1 Medio de cultivo	51

5.1.2	Extracción de ADN.....	52
5.1.3	Amplificación de la región ITS	53
5.1.3.1	Optimización del protocolo de amplificación de la región ITS.....	53
5.1.3.2	Análisis de variabilidad genética mediante marcadores RAPD.....	59
5.2	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.....	89
5.2.1	Tamaño de la lesión	92
5.2.2	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad-AUDPC.....	98
5.2.3	Tasa de esporulación.....	103
5.2.4	Porcentaje de infección.	108
5.2.5	Fenogramas.....	110
6.	CONCLUSIONES	113
7.	RECOMENDACIONES.....	114
	LITERATURA CITADA	115
	ANEXOS.....	126

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Cebadores utilizados para el estudio de ITS. Fuente: White <i>et al</i> , 1990, Duke University, en línea.	34
Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la amplificación de las regiones ITS.....	41
Tabla 3. Mezcla maestra para la amplificación de la región ITS.	42
Tabla 4. Características de los oligonucleótidos (Operon Technologies, Inc.) utilizados para determinar la variabilidad genética de 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i>	43
Tabla 5. Combinaciones de pares de cebadores RAPDs utilizadas.	43
Tabla 6. Reactivos, concentraciones y cantidades utilizadas para la amplificación de muestras de ADN mediante la técnica RAPDs.....	44
Tabla 7. Origen de los aislamientos provenientes del departamento de Putumayo.....	47
Tabla 8. Origen de los aislamientos provenientes del departamento de Nariño	48
Tabla 9. Número de loci generados con cada combinación de cebadores mediante RAPDs.	60
Tabla 10. Número de loci totales generados con las nueve combinaciones de cebadores.....	60
Tabla 11. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs con la combinación A (OPD 01 / OPBA 08).....	63
Tabla 12. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación D (OPD01 / OPD02).	65
Tabla 13. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación E (OPD01 / OPD03).	68
Tabla 14. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación H OPAN08 / OPAN19).	70
Tabla 15. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación J (OPAN 08 / OPD 01).	72
Tabla 16. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación M (OPAN19 / OPD02).....	75

Tabla 17. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs con la combinación W (OPAN 08 / OPD 02).....	78
Tabla 18. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación X (OPAN 08 / OPD 03).....	80
Tabla 19. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación Z (OPAN19 / OPD03).....	82
Tabla 20. Porcentaje de polimorfismo (BPBT × 100) para los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando las diferentes combinaciones.....	84
Tabla 21. Resumen del análisis de la varianza molecular de dos poblaciones de <i>Colletotrichum acutatum</i> (Nariño y Putumayo) evaluadas mediante ADN Polimórfico amplificado al azar.....	87
Tabla 22. Análisis de Varianza para tamaño de lesión en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.....	95
Tabla 23. Prueba de Múltiple Rangos por mezcla de aislamientos para tamaño de lesión en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD.....	95
Tabla 24. Prueba de Múltiple Rangos por genotipo para tamaño de lesión en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD.....	95
Tabla 25. Análisis de Varianza para tamaño de lesión en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.....	96
Tabla 26. Prueba de Múltiple Rangos interacción MEZCLA DE AISLAMIENTOS-GENOTIPO para tamaño de lesión en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD.....	97
Tabla 27. Análisis de Varianza para AUDPC en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.....	101
Tabla 28. Prueba de Múltiple Rangos por mezcla de aislamientos para AUDPC en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD.....	101
Tabla 29. Prueba de Múltiple Rangos por genotipo para AUDPC en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD.....	101
Tabla 30. Análisis de Varianza para AUDPC en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.....	102
Tabla 31. Prueba de Múltiple Rangos por mezcla de cepas para AUDPC en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD.....	102

Tabla 32. Prueba de Múltiple Rangos por genotipo para AUDPC en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD	102
Tabla 33. Análisis de Varianza para Tasa de Esporulación en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.....	106
Tabla 34. Prueba de Múltiple Rangos para Tasa de Esporulación para la interacción MEZCLA DE AISLAMIENTOS-GENOTIPO en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD.....	106
Tabla 35. Análisis de Varianza para Tasa de Esporulación en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.....	107
Tabla 36. Prueba de Múltiple Rangos para Tasa de Esporulación para la interacción MEZCLA DE AISLAMIENTOS-GENOTIPO en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD.....	107

LISTA DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1. Síntomas de Antracnosis en Tomate de árbol (Tallo, Hoja y Fruto). Fuente: Archivo GENPAT. 28
- Figura 2. Secuencias de los cebadores conservados para la amplificación por PCR y secuenciación del ARN ribosomal nuclear. Fuente: Duke University, en línea. 33
- Figura 3. Cambios de color de los frutos de tomate de árbol según su estado de madurez. Fuente: Norma Técnica Colombiana para tomate de árbol. 46
- Figura 4. Metodología de obtención de tamaño de lesiones de los aislamientos de *Colletotrichum* spp de Nariño y Putumayo. 49
- Figura 5. Crecimiento de los aislamientos MN9048 y MN9278, en caldo papa suplementado con pepetona y sacarosa. 51
- Figura 6. Gel de electroforesis en agarosa de 4 aislamientos de *Colletotrichum* spp. de Tomate de árbol proveniente del Valle de Sibundoy (Putumayo). El número entre paréntesis indica el protocolo utilizado, 1: protocolo de Gorge Mahuku modificado por Álvarez *et al*, 2005, 2: protocolo de Ordoñez, 2000, 3: protocolo universidad Nacional sede Palmira, 4: protocolo de extracción directa Griffith Gareth, Shaw David, 1998. 52
- Figura 7. Gel de electroforesis en agarosa de ADN diluido de 75 aislamientos de *Colletotrichum* spp. de cultivos de tomate de árbol del Valle de Sibundoy (Putumayo) y del departamento de Nariño. 53
- Figura 8. Amplificación de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de tomate de árbol del Valle de Sibundoy (Putumayo) y del departamento de Nariño con los cebadores universales ITS1, ITS2 e ITS4 y con los cebadores específicos CgInt (específico para *Colletotrichum gloeosporioides*) y Calnt2 (específico para *Colletotrichum acutatum*) 54
- Figura 9. Amplificación de *Colletotrichum* spp. usando CgInt+ITS 4. 55
- Figura 10. Amplificación de *Colletotrichum* spp. usando el cebador específico CgInt+ITS 4 con las siguientes temperaturas de alineamiento: 53°C, 57°C, 59°C, 61°C y 63°C. 55
- Figura 11. Geles para verificación de amplificación de ADN de los asilamientos de *Colletotrichum* spp. provenientes de los departamentos de Nariño y Putumayo. Cebadores específicos para *C. acutatum* (Calnt2 + ITS4). 57
- Figura 12. Geles para verificación de amplificación de ADN de los asilamientos de *Colletotrichum* spp. provenientes de los departamentos de Nariño y Putumayo. Cebadores específicos para *C. gloeosporioides* (CgInt + ITS4). 58
- Figura 13. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación A: cebadores OPD 01 / OPBA 08; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064:

	Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; V016: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-: Control negativo de la reacción.	62
Figura 14.	Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación D: cebadores OPD01 / OPD02; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; V016: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-: Control negativo de la reacción.	64
Figura 15.	Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación E: cebadores OPD01 / OPD03; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; V016: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-: Control negativo de la reacción.	67
Figura 16.	Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación H: cebadores OPAN08 / OPAN19; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; V016: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-: Control negativo de la reacción.	70
Figura 17.	Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación J (OPAN 08 / OPD 01); PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; V016: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-: Control negativo de la reacción.	72
Figura 18.	Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs utilizando la combinación M: OPAN19 / OPD02; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; V016: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-: Control negativo de la reacción.	75
Figura 19.	Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación W: cebadores OPAN 08 / OPD 02; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp). V064: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; V016: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-: Control negativo de la reacción.....	78
Figura 20.	Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación X: cebadores OPAN 08 / OPD 03; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp). V064: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; V016: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-: Control negativo de la reacción.	80
Figura 21.	Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación Z: cebadores OPAN19 / OPD03; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) V064: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; V016: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-: Control negativo de la reacción.	82
Figura 22.	Distribución de los 73 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> procedentes de Nariño y Putumayo mediante ADN Polimórfico Amplificado al Azar, RAPDs,	

en función de sus patrones génicos. Dendrograma consenso construido usando el método de promedios no ponderados (UPGMA) y el empleo del coeficiente de Jaccard, valor $r = 0.7101$	86
Figura 23. Agrupamiento de genotipos de Tomate de acuerdo a sus características fenotípicas. En rojo los genotipos seleccionados para este estudio.....	90
Figura 24. Primeros síntomas de la infección por <i>Colletotrichum</i> spp. en los genotipos evaluados	91
Figura 25. Avance de la infección por <i>Colletotrichum</i> spp. en los genotipos evaluados.....	92
Figura 26. Tamaño de la lesión ocasionada por (en milímetros) la mezcla de aislamientos provenientes de los departamentos de Putumayo (A) y Nariño (B) inoculada en frutos pintones de tomate de árbol.....	93
Figura 27. Tamaño de la lesión ocasionada por (en milímetros) la mezcla de aislamientos provenientes de los departamentos de Putumayo (A) y Nariño (B) inoculada en frutos verdes de tomate de árbol.	94
Figura 28. Tasa de crecimiento (AUDPC) de los aislamientos provenientes de los departamentos Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos pintones de tomate de árbol.....	99
Figura 29. Tasa de crecimiento (AUDPC) de los aislamientos provenientes de los departamentos Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos verdes de tomate de árbol.....	100
Figura 30. Tasa de esporulación de los aislamientos provenientes de los departamentos Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos pintones de tomate de árbol. .	104
Figura 31. Tasa de esporulación de los aislamientos provenientes de los departamentos Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos verdes de tomate de árbol.....	105
Figura 32. Porcentaje de infección de los aislamientos provenientes de los departamentos de Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos pintones de tomate de árbol.....	109
Figura 33. Porcentaje de infección de los aislamientos provenientes de los departamentos de Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos verdes de tomate de árbol.....	110
Figura 34. Fenograma de agrupamiento de la mezcla de aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> inoculadas en los frutos pintones.....	111
Figura 35. Fenograma de agrupamiento de los genotipos pintones inoculados con <i>Colletotrichum acutatum</i>	111
Figura 36. Fenograma de agrupamiento de la mezcla de aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> inoculadas en los frutos verdes.	112
Figura 37. Fenograma de agrupamiento de los genotipos verdes inoculados con <i>Colletotrichum acutatum</i>	112

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. DATOS DE PASAPORTE DE LOS AISLAMIENTOS PROVENIENTES DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO.....	127
ANEXO 2. DATOS DE PASAPORTE DE LOS AISLAMIENTOS PROVENIENTES DEL DEPARTAMENTO DE PUTUMAYO.....	128
ANEXO 3. DATOS GENOTIPOS DE TOMATE DE ÁRBOL SELECCIONADOS PARA PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.....	130

INTRODUCCIÓN

Dentro de los cultivos frutícolas de clima frío moderado en Colombia, el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt) constituye una alternativa de gran importancia socioeconómica, como cultivo principal o de rotación. El aumento en el área sembrada durante la última década, le ha permitido alcanzar las 7047 hectáreas, siendo las franjas comprendidas entre los 1600 y los 2400 msnm, las principales zonas productoras. El alto potencial de rendimiento del cultivo por unidad de área, si bien es una característica importante que ofrece excelentes perspectivas para la generación continua de ingresos por su estabilidad en el mercado nacional y por las expectativas como generador de divisas en algunos mercados internacionales, se ve seriamente afectado y disminuido en términos reales por el incremento de diversos factores limitantes, entre los que se destaca la generalización de los problemas fitosanitarios (CORPOICA, 1999), como la antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., que es la enfermedad más importante de las que afectan la fruticultura a nivel mundial y nacional, debido a la severidad de los daños que ocasiona, la magnitud de las pérdidas generadas tanto en producción como en calidad de la cosecha y la dificultad que se presenta para su control (MADR, 2006).

La enfermedad presenta niveles de incidencia y severidad cada vez más altos en todas las zonas productoras y sus pérdidas superan el 40% con control y sin él se puede perder hasta el 100% de la producción, con la secuela del abandono de cultivos en algunas regiones, por los bajos rendimientos y la inminente evolución de la severidad de la enfermedad, lo que pone en peligro la producción nacional de la fruta. Esta característica unida a la dependencia exclusiva de fungicidas para su control, trae como consecuencia la disminución significativa del ciclo productivo del cultivo (CORPOICA, 1998), esto sin tener en cuenta los serios problemas de contaminación ambiental, los daños ecológicos y costos socioeconómicos que ocasiona el uso indiscriminado de fungicidas químicos empleados por los productores para el control de la enfermedad y que redundan en el empleo de más de 30 productos en distintas combinaciones, frecuencias, dosis y formulaciones (MADR, 2006).

La antracnosis del tomate de árbol es causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, aunque estudios sobre caracterización biológica indican la presencia de una especie más, *C. acutatum* (Saldarriaga, et al., 2008). Estos hongos que atacan hojas, ramas, flores y frutos, pueden ser dispersados de planta a planta y de cultivo a cultivo por el viento, la lluvia, los insectos o el mismo agricultor y se caracteriza por la aparición de lesiones oscuras, hundidas y bien delimitadas por una o más aureolas concéntricas que posteriormente secan las zonas afectadas, dejándolas con la apariencia de quemazón. Lo anterior ocasiona una deformación de los frutos, que en la mayoría de los casos termina produciendo su caída (Rondón, 2003).

La demanda de alternativas para el manejo de la enfermedad ha creado la necesidad de realizar estudios básicos orientados hacia el diagnóstico y caracterización de las especies porque la identificación correcta de un organismo permite conocer los patrones de comportamiento de la especie o del grupo taxonómico y facilita el desarrollo de alternativas tecnológicas para la estructuración de planes de manejo de la enfermedad. Además, el conocimiento de la especie del hongo que predomina en una plantación es importante, teniendo en cuenta que las especies de *Colletotrichum* pueden diferir en el grado de sensibilidad a fungicidas (Saldarriaga *et al.*, 2008; Corpoica, 1998).

La identificación de especies de *Colletotrichum* por métodos tradicionales puede no ser suficiente para la identificación de especies y subespecies, lo cual es crítico para el manejo de la enfermedad, mejoramiento genético del cultivo y control del patógeno. La compatibilidad vegetativa y técnicas moleculares ofrecen medidas complementarias para la caracterización de los taxa. Dichas técnicas han sido utilizadas exitosamente para la identificación y determinación de la diversidad genética de poblaciones de *Colletotrichum*. En recientes estudios, se han usado cebadores específicos de especies para diferenciar entre aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* de cítricos (Tapia *et al.*, 2008; Andra *et al.*, 2007; Freeman *et al.*, 2001).

Para contribuir en la búsqueda de soluciones a la problemática, se propuso el presente trabajo, en el cual se realizó la caracterización molecular y patogénica de *Colletotrichum* spp. en cultivos de tomate de árbol del Valle de Sibundoy (Putumayo) y del departamento de Nariño, mediante el análisis de la región ITS (Internal Transcribed Spacer), la aplicación del marcador RAPD y la evaluación del grado de reacción de frutos de algunos genotipos seleccionados de *Cyphomandra betacea* contra aislamientos representativos de las poblaciones de *Colletotrichum* spp. Encontrando que la especie de *Colletotrichum* que ataca los cultivos de tomate de árbol en los dos departamentos es *Colletotrichum acutatum*, y que ésta presenta alta variabilidad intraespecífica. Con relación al análisis patogénico, se estableció que la mezcla de aislamientos mas agresiva fue la proveniente del municipio de Santiago (Putumayo) y la menos agresiva la de Sibundoy (Putumayo) y Buesaco (Nariño).

1. TITULO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PATOGENICA DE *Colletotrichum spp.* EN CULTIVOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea (Cav.) Sendt*)

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento del agente causante de la antracnosis (*Colletotrichum* spp.) en cultivos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (cav.) Sendt) de los departamentos de Nariño y Putumayo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar molecularmente las especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a cultivos de tomate (*Cyphomandra betacea* (cav.) Sendt) mediante el análisis de la región del espaciador interno transcrito ITS del ADN ribosomal.

Determinar la variación intrapoblacional de las especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a cultivos de tomate (*Cyphomandra betacea* (cav.) Sendt) mediante el marcador molecular RAPD.

Evaluar patogénicamente la mezcla de asilamientos, por origen geográfico, de *Colletotrichum* spp. en diferentes genotipos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (cav.) Sendt).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt)

Colombia dedica aproximadamente 42000ha de tierra a cultivos de cítricos y 13500ha y 7500ha a tomate de árbol y mango, respectivamente (Cadavid *et al.*, 2007). La producción de tomate de árbol se encuentra en 18 departamentos, aunque se concentra en Antioquia (50%) y Cundinamarca (14%). Antioquia supera el rendimiento promedio nacional alcanzando un rendimiento de 31,2 t ha⁻¹ frente al promedio nacional de 18 t ha⁻¹ (MADR, 2006). Los costos de producción del cultivo indican una alta dependencia de la mano de obra, que alcanza un 39% representada en 277 jornales ha⁻¹, seguidos por el empleo de agroquímicos que participan con el 27% y el costo de la tierra que asciende al 16%. 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 agroquímicos que generalmente conducen a sobrefertilización y al empleo excesivo de insecticidas y fungicidas, el manejo inapropiado de la poscosecha, especialmente en lo relacionado con el empaque y transporte y la ausencia de adecuada asistencia técnica profesional (MADR, 2006; MAG/IICA, 2001).

El tomate de árbol es una planta de tipo arbustivo originaria de la zona andina suramericana, se encuentra aún de forma silvestre en los bosques de varios países como Colombia, Perú, Ecuador y Bolivia. Se cultiva principalmente en Colombia, Ecuador y Perú y en los últimos años su siembra se ha expandido a algunos países africanos (Zambia y Zimbabwe), asiáticos (Sri Lanka e India) y Nueva Zelanda (MADR, 2006).

La clasificación taxonómica del tomate de árbol es la siguiente:

Reino: Vegetal
División: Angiosperma
Clase: Dicotiledónea
Orden: Tulifloras
Familia: Solanaceae
Género: *Cyphomandra*
Especie: *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt

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, como 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, 2006; MAG/IICA, 2001).

El tomate de árbol se caracteriza por ser una fruta altamente nutritiva, rica en vitaminas A y C, minerales como calcio, hierro y fósforo y que presenta bajos niveles de calorías. Tiene un alto contenido de pepsina, pH ácido y sabor agrídulce, factores que la hacen atractiva para el procesamiento industrial (MADR, 2006).

El tomate de árbol en forma natural alcanza de 2 a 3 m de altura, con un tallo semileñoso y una copa que se desarrolla en diversas formas dependiendo de la ramificación del tallo y el tipo de propagación. Los frutos son bayas carnosas, halocárpicas, biloculares, reniformes u ovoides. Su tamaño varía de acuerdo con la variedad, edad de la planta y fertilidad del suelo donde se encuentre. Presenta ciclo vegetativo perenne. Se desarrolla bien en climas medios y fríos, en alturas entre 1700 a 2500 msnm y temperaturas óptimas entre 9°C y 20°C. Como no requiere una alta humedad, se cultiva frecuentemente en zonas altas de clima seco (Lobo, 2002).

En cuanto a la fenología del tomate de árbol, se presentan dos épocas de crecimiento, una intensa en verano que coincide con elongación de ramas, formación de yemas laterales y hojas nuevas, y a su vez con renovación de follaje, y una leve en invierno. La fase reproductiva presenta floración permanente en el año, con un mayor cuajamiento de frutos en el primer semestre. La cosecha aunque continua, es mayor al final de cada invierno del primero y segundo semestre. Se requiere de un crecimiento vegetativo permanente para que exista producción en el árbol, razón que justifica el manejo del árbol mediante podas. La estructura reproductiva es un racimo escorpioide que desarrolla entre 23 y 35 flores de las cuales cuajan en promedio de 1 a 8 frutos máximo; la edad del fruto, de formación a maduración, está entre 24 y 27 semanas (CORPOICA, 1999).

La producción comienza entre los doce y catorce meses después de la siembra. La fase productiva depende del manejo que se dé al cultivo, alcanzando bajo las condiciones actuales entre 17 y 44 meses. En general, los agricultores utilizan distancias de siembra que van de 2x2 m entre plantas, permitiendo poblaciones de 2500 plantas por hectárea, hasta 3.5 x 3.5 m en triángulo, con cerca de 1 100 plantas por hectárea (MADR, 2006).

3.2 COLLETOTRICHUM SPP.

El género *Colletotrichum* fue descrito por Tode en 1790 bajo el nombre de *Vermicularia*, nombre que fue validado por Fries en 1825. Penzig en 1882, describió a *Vermicularia gloeosporioides*, hoy conocido como *C. gloeosporioides*, cuando fue aislado en Italia de las hojas de un cítrico. Más tarde, Saccardo en 1884, transfirió a *Vermicularia* al género *Colletotrichum* y aplicó este nombre a los hongos habitantes de las hojas que eran similares a *Colletotrichum*. *Colletotrichum* fue establecido como género por Corda en 1831, quien lo describió como un hongo caracterizado por acérvulos setosos y conidias hialinas y fusiformes (Gaztambide, 2005).

Von Arx (1970) describe el estado anamorfo de *Glomerella*, el género *Colletotrichum*, con acérvulos intra o subepidermales, con variaciones en tamaño y forma, glabrosos o setosos. Las setas son oscuras u ocasionalmente casi hialinas que surgen de la base del acérvulo. Las conidias son elipsoidales, cilíndricas y forman apresorios al germinar. Además, describe para *C. gloeosporioides* acérvulos oscuros o claros, setosos o glabrosos. Las conidias son cilíndricas o elipsoidales, redondeadas en los extremos, atenuadas o truncadas, hialinas y forman masas de esporas anaranjadas a rosadas (Gaztambide, 2005).

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 precosecha y poscosecha en los trópicos. Su habilidad para causar infecciones latentes lo ubica entre los patógenos más importantes de la poscosecha (Rodríguez, 2007).

Glomerella es uno de los más grandes géneros de hongos Ascomicetes y contiene especies que están entre los hongos fitopatógenos más exitosos, causando daño a los cultivos en las regiones tropicales, subtropicales y templadas. 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, del desarrollo de la infección y de los sistemas de pronóstico de las enfermedades (Rodríguez, 2007).

Este hongo presenta un micelio septado de coloración hialina o castaña clara, los acérvulos separados tienen forma de disco o cojín, de textura cerosa y puede ubicarse en forma subepidermal, epidermal o subcuticular. Típicamente presenta setas o espinas negras en los bordes o entre el conidióforo. Los acérvulos están formados por pseudoparénquima con paredes delgadas o gruesas, conidióforos simples y elongados con numerosas conidias. Las conidias son hialinas, curvadas, fusiformes y producidas en estructuras especializadas llamadas acérvulos, que se forman en la superficie de los tejidos infectados. El género *Colletotrichum* tiene enorme variación ecológica, morfológica y patológica, las diferentes formas en la naturaleza varían desde saprófito a cepas parasíticas con un estrecho rango de hospederos. Las conidias son producidas en masas mucilaginosas típicamente hundidas, de color rosado y con un contorno irregular en lesiones necróticas (Rodríguez, 2007).

Las especies de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis en diversos cultivos, exhiben dos fases principales de nutrición, durante la colonización de la planta. La fase inicial biotrófica en la cual se obtienen los alimentos de las células vivas, y la segunda fase tardía necrotrófica donde los alimentos se obtienen de las células hospederas muertas a

causa del ataque del patógeno. La fase biotrófica es de corta duración y en ésta se asegura el establecimiento del patógeno, sin daños severos en el tejido vegetal. La expresión enzimática para degradar la pared vegetal está estrictamente limitada durante esta fase y la planta hospedera parece no reconocer al patógeno. En consecuencia, no se desencadena respuesta de defensa. A la fase necrotrófica se asocia la aparición de los síntomas de la antracnosis, con una estrecha relación entre dicha aparición, el incremento en la expresión enzimática para degradar la pared celular vegetal y la virulencia del patógeno (Cerón *et al.*, 2006).

El crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum* spp. presenta algunas similitudes con el desarrollo necrótrofo, en lo que se refiere a la expresión enzimática, la rápida colonización y utilización de la fuente de alimento y la producción de amonio en respuesta a pH ácido *in vitro*, incrementando de esta forma el pH hasta obtener el nivel óptimo para la actividad pectatoliasa. Se ha reportado el incremento del pH del medio, tanto en el crecimiento necrótrofo como en el saprófito, para algunos hongos asociados a la antracnosis pre y poscosecha de frutos, su relación directa con la activación de enzimas para la degradación de pectinas; así como la importancia de estos factores en el desarrollo de la patogenicidad de hongos y bacterias (Cerón *et al.*, 2006).

La búsqueda de alternativas duraderas para el control de enfermedades vegetales y que además sean amables con el ambiente, como es el caso del uso de elicitors fúngicos (moléculas derivadas del hongo que son capaces de estimular mecanismos metabólicos de defensa vegetal) requiere, entre otros, del conocimiento de la biología y de las características óptimas de cultivo del patógeno (Cerón *et al.*, 2006).

3.2.1 Clasificación taxonómica de *Colletotrichum*. Su distribución es mundial y actualmente el taxón se considera constituido por 39 especies entre las que se encuentran tanto saprófitas como parásitas. Las especies patogénicas causan serias pérdidas en un amplio número de plantas cultivadas entre las que se cuentan cereales, pastos, frutales, leguminosas, y cultivos perennes en regiones tropicales y subtropicales. Los síntomas de ésta enfermedad son frecuentemente una lesión llamada antracnosis, pudiendo lesionar la mayor parte de la planta (Rodríguez, 2007). Al menos dos distintas especies de *Colletotrichum* se han asociado comúnmente con plantas de tomate de árbol: *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

La clasificación taxonómica de *Colletotrichum* según NCBI, 2007 (National Center for Biotechnology Information), mediante caracterización molecular por ITS es:

Dominio: Eukaryota
Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes incertae sedis
Orden: Phyllachorales
Familia: Phyllachoraceae mitospóricos
Género: Glomerella (anamorfo: 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. 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).

3.2.2 Colletotrichum gloeosporioides (Penz. & Sacc.) (1884). Es una especie de amplia distribución en todo el mundo, especialmente en zonas tropicales y subtropicales. Se considera una especie heterogénea por su notable variación morfológica en cultivo. Pocos progresos se han realizado en la sistemática e identificación de los aislamientos 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 (CORPOICA, 1999).

3.2.2.1 Colletotrichum gloeosporioides asociado a antracnosis de tomate de árbol. *Colletotrichum gloeosporioides*, es un microorganismo que en la naturaleza vive de la materia orgánica y en ocasiones especiales tiene la capacidad de volverse patógeno, prefiriendo atacar tejidos muy jóvenes o tejidos muy viejos y físicamente débiles. Los ataques más severos a los frutos ocurren cuando coinciden con el estado más susceptible del cultivo (floración, fructificación) con un tiempo lluvioso y días de permanente humedad relativa, mayor del 90%. Las fuentes de inóculo se encuentran en las hojas, ramas, inflorescencias, brácteas de las flores y en los frutos (CORPOICA, 1999).

Una característica de la antracnosis en frutos de tomate de árbol es la presencia de infecciones latentes que pueden durar unos pocos días o varias semanas, inclusive meses, originando las infecciones quiescentes, las cuales son activadas por cambios bruscos de temperatura, daños al tejido por insectos, daños mecánicos, senescencia de tejidos o sobremaduración de los frutos, lo que produce lesiones necróticas durante la precosecha o poscosecha, que en condiciones normales no son detectadas (CORPOICA, 1999).

El periodo de latencia es el tiempo que va desde la infección hasta que se convierte en tejido infeccioso (propágulo). La infección quiescente se describe como una relación parasítica latente, que después de un tiempo prolongado cambia a una forma activa. Pérdidas causadas por efecto de la enfermedad se dan en diferentes estados de crecimiento vegetativo, sobre todo en caída prematura de inflorescencias y frutos, ocasionando disfunciones fotosintéticas y fisiológicas, y pérdidas poscosecha por fenómenos de infecciones latentes o quiescentes. La quiescencia se puede mostrar como una espora no germinada, a través de los síntomas como infecciones internas a visibles, pero no en lesiones no expandidas como la mancha fantasma del tomate (Alarcón y Chavarriaga, 2007).

Los estudios han demostrado que este patógeno tiene gran facilidad para asociarse con otros microorganismos, especialmente con bacterias del tipo *Pseudomonas*, que actúan en asocio (sinergismo) y le permiten una mejor germinación y formación de órganos que le facilitan la infección (apresorio), mientras la bacteria se beneficia, obteniendo del lugar donde producen las esporas elementos nutritivos como el hierro para formar metabolitos (sideróforos) (CORPOICA, 1999; Rondón, 2003). Un organismo se puede tornar quiescente durante la germinación, elongación del tubo germinativo, formación del tubo germinativo, formación del apresorio, penetración y colonización, debido a condiciones fisiológicas y físicas adversas que pueden ser impuestas temporalmente por el hospedero sobre el patógeno, por modificación de la capacidad patogénica del organismo y por resistencia temporal del hospedero (fitoalexinas) (Alarcón y Chavarriaga, 2007).

3.2.3 *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds (1968). Es un hongo que produce colonias blancas, que llegan a ser grisosas, en la superficie inferior de color rosado a carmín, carecen de esclerocios, presenta apresorios pálidos a café oscuro, en forma ovalada o de clavo, con las márgenes enteras o ligeramente lobuladas de 8.5-10 x 4.5-6µm y masas de conidias de color rosado a naranja de 8.5-16.5 x 2.5-4µm. Se diferencia de *C. gloeosporioides* por su tasa de crecimiento lento (Rodríguez, 2007).

Colletotrichum acutatum y *C. gloeosporioides* son morfológicamente similares, con rangos de hospederos solapantes, y los aislamientos en cultivo exhiben una gran variabilidad, lo que hace muy difícil separarlos por los métodos taxonómicos tradicionales. Sin embargo la biología molecular ha 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 las técnicas de biología molecular ha conducido a la reclasificación de varios aislamientos de *C. gloeosporioides* como *C. acutatum* (Rodríguez, 2007).

3.3 ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es considerada la enfermedad más importante en cultivos de frutales, lo que se debe a su amplia distribución y a la magnitud de las pérdidas que genera. Su control es muy deficiente debido principalmente al desconocimiento de las relaciones de la enfermedad con sus fuentes de inóculo y de la estructura poblacional del patógeno y sus niveles de variación (Cadavid *et al.*, 2007).

La antracnosis se presenta en hojas, tallos y frutos, formando en el follaje lesiones que se localizan especialmente en las hojas más viejas y se presentan como manchas necróticas concéntricas de color negro a lo largo de las nervaduras, siendo más conspicuas en el envés. Las lesiones en los frutos aparecen ligeramente hundidas, de color negro y bien definidas (Figura 1).



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

La mayor parte de las pérdidas en la producción ocurren cuando las especies de *Colletotrichum* atacan los frutos. La antracnosis es una enfermedad que puede afectar frutos inmaduros y en desarrollo en el campo (precosecha) y frutos maduros en la cosecha y durante el almacenamiento (poscosecha). Esta última, 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 (Peres *et al.*, 2005).

Las infecciones quiescentes en el contexto de enfermedades poscosecha involucran la inhibición del desarrollo del patógeno a través de condiciones fisiológicas impuestas por el hospedero hasta que se lleva a cabo el estado de maduración. Una vez el hongo penetra la capa exterior del fruto, éste permanece allí en estado de quiescencia o dormancia hasta que ocurren cambios en la superficie del fruto, los cuales proporcionan las condiciones adecuadas para permitir una infección (Contreras, 2006). El estado fisiológico del hospedero cambia, en la medida en que madura y envejece. El almacenamiento, el daño mecánico, las temperaturas extremas y la anoxia también alteran la fisiología de éste y cuando los cambios fisiológicos inhiben las respuestas de defensa a las actividades del

patógeno, la interacción es compatible, conduciendo a la colonización del hospedero y a la enfermedad. En consecuencia es probablemente más útil definir la resistencia y susceptibilidad de los frutales a enfermedades de poscosecha en términos del periodo de incubación después de la maduración, con cultivares resistentes que tienen un largo periodo de almacenamiento y aquellos de periodos cortos como susceptibles (Wharton y Diéguez, 2004).

Las primeras etapas de desarrollo de hongos durante el proceso de infección son esencialmente las mismas para todas las especies de *Colletotrichum*, y se puede separar en siete etapas: 1. Colonización de las conidias a la superficie de las plantas, 2. Adhesión de las conidias a las superficie, 3. Germinación de las conidias, 4. Producción de apresorios, 5. Penetración de la epidermis de la planta, 6. Crecimiento y colonización de los tejidos vegetales y, 7. Producción de acérvulos y esporulación (Wharton y Dieguez, 2004).

Una característica importante para la dispersión y adhesión de las conidias y ascosporas de muchas especies de *Colletotrichum*, es que estas están envueltas con una sustancia mucilaginosa hidrofílica. La sustancia mucilaginosa está compuesta principalmente de polisacáridos y glicoproteínas de alto peso molecular. Su función es mantener la viabilidad de las conidias bajo condiciones adversas como las temperaturas extremas, luz ultravioleta y humedad baja, al mismo tiempo, protege las esporas de los materiales tóxicos producidos por los tejidos vegetales hospederos durante el desarrollo de una lesión (Gaztambide, 2005).

El proceso de penetración es una etapa crítica en la interacción planta-patógeno. En *Colletotrichum*, la penetración de los tejidos del hospedero generalmente depende de la formación de una estructura de infección especializada llamada apresorio, la cual permite al hongo penetrar la cutícula y las células epidermales de la pared del hospedero. Sin embargo, hay reportes de penetración directa de tejidos a través de los estomas, o heridas sin la formación del apresorio (Parra, 2008).

Como se mencionó anteriormente, los eventos de pre-penetración son básicamente los mismos para todas las especies de *Colletotrichum*, algunas diferencias comienzan a aparecer después de la penetración, cuando dos tipos de estrategias de infección se pueden distinguir: la hemibiotrófica intracelular y la necrotrófica subcuticular intramural (Parra, 2008).

Muchas especies de *Colletotrichum* inicialmente establecen infección por medio de una corta fase biotrófica, asociada con una larga hifa intracelular primaria, y luego pasan a una fase necrotrófica asociada con una estrecha hifa secundaria, la cual se ramifica totalmente en el tejido del hospedero. En las especies que adoptan esta estrategia, la fase biotrófica inicial puede variar en duración de menos de 24 h o por encima de 72 h. La hifa primaria formada por estas especies también puede variar en morfología (Parra, 2008).

El inicio de la fase biotrófica en especies hemibiotróficas de *Colletotrichum* es seguida de una fase necrotrófica, la cual inicia con la aparición de una hifa secundaria. Esta hifa se ramifica a través del tejido hospedero de forma inter e intracelular. En este estado las paredes celulares son degradadas por enzimas fúngicas despolimerizadoras y las células hospederas mueren rápidamente. La fase biotrófica se caracteriza por la producción de un micelio inicial primario y la transición a un micelio secundario, las hifas de penetración aumentan y se hinchan para formar vesículas de infección y la membrana plasmática vegetal se invagina alrededor de la vesícula infectiva. Las hifas primarias colonizan progresivamente nuevas células epidérmicas y mesófilas, llegando a constreñirlas con su paso a través de las células. La matriz interfacial que separa la membrana plasmática de la planta de la pared celular fúngica se mantiene y nuevamente infecta las células que permanecen viables por algún tiempo (Contreras, 2006). Aproximadamente, 48 horas después de la penetración inicial, la hifa necrotrófica se forma. Dicha hifa no está rodeada por una capa matricial. La hifa secundaria secreta enzimas que degradan la pared celular en su avance, se dispersan y se expanden rápidamente generando lesiones necróticas (Peres *et al.*, 2005).

Durante el estado inicial de la infección, algunas especies de *Colletotrichum* crecen exclusivamente bajo la cutícula y dentro de la pared de las células epidérmicas. En este tipo de infección, después de la germinación de las esporas se forma el apresorio melanizado, desde el cual se desarrolla la hifa de penetración. La cutícula del hospedero es penetrada y las hifas del hongo se diseminan subcuticularmente dentro de las paredes de las células epidérmicas del hospedero, causando la disolución de la estructura de la pared, seguido por la muerte celular (Wharton y Dieguez, 2004).

Durante las primeras 24 horas después de la penetración no hay evidencia visible de la infección, algo que, como en el estado inicial de la infección hemibiotrófica ocurre con ausencia de síntomas. Después del crecimiento hifal dentro de la pared de la capa de las células epidérmicas y dentro de las paredes de las células corticales, se produce una red intramural a través del tejido de hifas, en los dos días siguientes. Algunas especies de *Colletotrichum* pueden emplear los dos tipos de estrategias infectivas, como por ejemplo la infección producida por *C. gloeosporioides* en *Stylosanthes* spp. (Contreras, 2006).

Cuando los tejidos de la planta son colonizados exitosamente por *Colletotrichum*, por medio de infección hemibiotrófica y/o subcuticular, intramural, el cual crece activando un comportamiento necrotrófico clásico, la fase necrotrófica es responsable de los síntomas de la antracnosis y añublos que son enfermedades típicas causadas por *Colletotrichum*. Durante este estado el patógeno crece extensamente a través del tejido hospedero, dentro de las células, en las paredes, a través de las paredes y en espacios intercelulares. Pese a la dispersión y la destrucción de los tejidos, otro aspecto importante y raramente conocido de la fase de crecimiento necrotrófica es que las cutículas de los frutos afectados permanece intacta, sugiriendo que las cutinasas están involucradas en la penetración

inicial de la superficie de la planta, entonces la subsecuente síntesis y/o actividad de estas enzimas debe ser inhibido. Una cutícula intacta puede tener varias funciones. Esta puede actuar para mantener el patógeno dentro del tejido infectado, pero es de mayor importancia, el papel aún no definido en la reproducción de *Colletotrichum*. La producción tanto del acérvulo como del peritecio sobre la superficie de la planta requiere una cutícula intacta (Contreras, 2006).

Durante la fase asintomática, algunos de estos patógenos invaden las células sin matarlas, es sobre esta base que muchas especies de *Colletotrichum* han sido consideradas como hemibiotróficas. Este hongo es conocido como "patógeno intracelular hemibiotrófico", donde se hace énfasis no solo en su naturaleza biotrófica sino en su capacidad para penetrar la pared celular y crecer dentro de la lumena. Para otras especies de *Colletotrichum* la penetración de la cutícula es seguida por un crecimiento bajo la cutícula, donde, a diferencia de otros patógenos subcuticulares, disuelve extensamente la matriz péptica de la pared de las células epidermales (Bailey 1992). Algunas especies como *C. acutatum* pueden presentar varias estrategias de infección como el crecimiento biotrófico, el desarrollo necrotrófico intramural y subcuticular y un desarrollo intra e intercelular y hemibiotrófico subcuticular (Peres *et al.*, 2005).

En este trabajo se tuvo en cuenta la terminología propuesta por Vanderplank (1984) que define virulencia, avirulencia, agresividad y patogenicidad:

Virulencia: se refiere a la aptitud de la cepa para interactuar con una línea de hospederos compatibles, culminando en la expresión de síntomas típicos de la enfermedad (independientemente de la severidad de esos síntomas).

- ✓ Avirulencia: hace referencia a la inhabilidad para causar enfermedad en una planta resistente.
- ✓ Agresividad: se refiere a la intensidad de los síntomas inducidos por una cepa en particular en un hospedero compatible, puede por consiguiente ser estimada por medir la cinética de desarrollo de enfermedad, por la clasificación de los diferentes tipos de síntomas o por otro rasgo cuantitativo.
- ✓ Patogenicidad: se refiere a la potencialidad de una cepa para inducir enfermedad o respuesta de hipersensibilidad (RH), que son dos típicos tipos de interacciones específicas para patógenos de plantas.

De acuerdo con estas definiciones virulencia y agresividad son componentes de la patogenicidad.

3.4 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE *Colletotrichum* spp.

Los estudios sobre la genética en los hongos fitopatógenos se han basado en el análisis de sus características morfológicas y bioquímicas. Sin embargo, estos métodos han demostrado ser insuficientes. En años recientes, la introducción de las técnicas de hibridación de ADN y las que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han usado para tener un diagnóstico muy preciso de las enfermedades causadas por hongos, para la identificación y taxonomía, para la determinación de los modos reproductivos de hongos asexuales y su sistemática entre otros (Manzo, 2001)

Dentro del genero *Colletotrichum* se incluyen hongos tanto saprofitos como fitopatógenos. Estos últimos inicialmente se nombraron de acuerdo con la planta hospedera de la cual se aisló, pero el esquema no es satisfactorio ya que esta forma no revela las verdaderas relaciones entre las especies de hongos (Narayanasamy, 2008).

Los métodos tradicionales para la discriminación entre especies de *Colletotrichum* se han basado principalmente en la morfología, analizando características tales como tamaño y forma de las conidias, color de la colonia, presencia o ausencia de setas y la existencia del teleomorfo *G. cingulata*. Sin embargo, debido a las influencias medioambientales en la estabilidad de las características morfológicas y la existencia de formas intermedias, estos criterios no son siempre los adecuados para la diferenciación confiable de las especies de *Colletotrichum*. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), al usar cebadores que se anidan a secuencias específicas, es una técnica molecular rápida y confiable para diferenciar entre especies del complejo *Colletotrichum* (Freeman *et al.*, 1998; Freeman y Katan, 1997).

La aplicación de los marcadores moleculares en la taxonomía de los hongos promete aclarar las relaciones entre los distintos taxones que se encuentran poco separados a causa de los estudios morfológicos. Esto es de especial importancia debido a que permite entender la identidad y complejidad genética de una población de patógenos que afectan un hospedero en particular y así mismo es esencial para formular estrategias efectivas de manejo de enfermedades (Narayanasamy, 2008).

En estudios de *Colletotrichum*, el trabajo se ha concentrado en dos partes del genoma: mitocondrial (ADNm) y ribosomal (ADNr). Ambos están presentes como múltiples copias dentro de la célula, las cuales permiten el análisis con condiciones experimentales menos severas. Además, de estos genes, se ha incrementado el uso de secuencias de genes como la β tubulina y el factor de Elongación 1 alpha (EF-1 α) (Freeman y Katan, 1997; Talhinhos *et al.*, 2002).

3.4.1 Espaciadores de transcripción interna (Internally Transcribed Spacers ITS). El ribosoma de los eucariotas posee dos subunidades de ADN ribosomal (ADNr) con diferentes gradientes de sedimentación: 40S y 60S, el cual está codificado por tres genes, la subunidad grande (28S), la subunidad pequeña (18S) y el gen 5.8S, separados por las regiones de los espaciadores de transcripción interna (ITS) (Figura 2). La región de los ITS por el hecho de ser intrones es un área de alta variabilidad al no tener función biológica aparente y por esto acumula mutaciones neutrales a lo largo del tiempo, lo que permite diferenciar individuos relacionados genéticamente (Duke University, en línea).

La región ITS es quizá ahora el fragmento de ADN más secuenciado en hongos (Tabla 1). Ha sido muy útil para estudios de sistemática molecular a nivel de especie e incluso dentro de especies, por ejemplo, para identificar razas geográficas (Duke University, en línea).

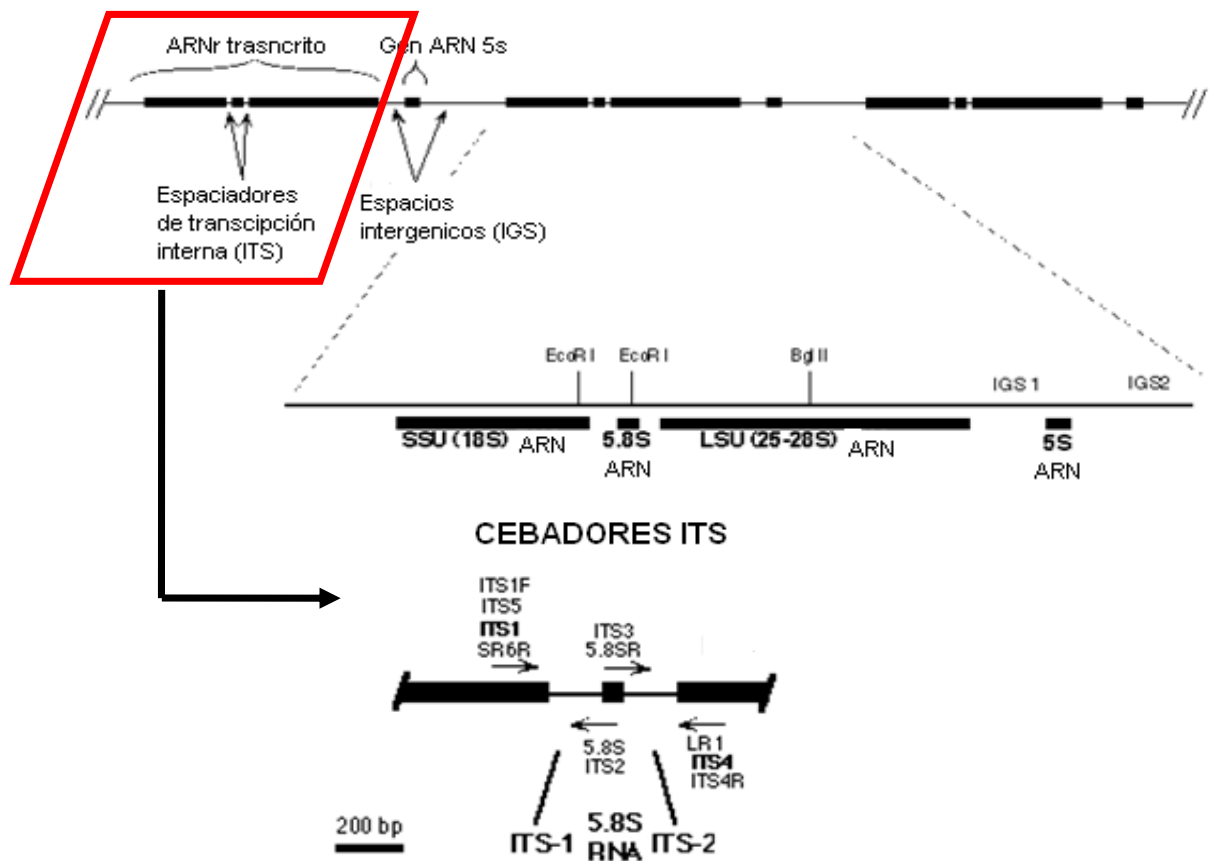


Figura 2. Secuencias de los cebadores conservados para la amplificación por PCR y secuenciación del ARN ribosomal nuclear. Fuente: Duke University, en línea.

Tabla 1. Cebadores utilizados para el estudio de ITS. Fuente: White *et al.*, 1990, Duke University, en línea.

Nombre cebador	Secuencia (5'->3')	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> , 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes & Bruns, 1993
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	Vilgalys lab
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG	Vilgalys lab
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG	Vilgalys

3.4.2 Fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPDs). Esta técnica se basa en la utilización de un cebador de pequeño tamaño, generalmente 10 nucleótidos, y de secuencia arbitraria por lo que no requiere el conocimiento previo del genoma de la especie a estudiar. De esta manera multitud de fragmentos son amplificados con cada grupo de cebadores en cada genoma. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en trabajos previos de variabilidad genética con poblaciones de *Colletotrichum* spp. debido al no requerimiento de información de la secuencia a analizar, a su alto grado de polimorfismo, bajo costo de funcionamiento y estructura, el no uso de radioactividad, simplicidad, rapidez y la reducida cantidad de ADN requerida (Campos, 1995; Kelemu *et al.*, 1999; Becerra y Paredes, 2000; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003). Además de los estudios de variación genética, RAPDs, tiene una gran potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica (Becerra y Paredes, 2000).

No obstante, los RAPD tienen también algunos inconvenientes. En su mayor parte presentan una herencia dominante y, la principal objeción a la que se enfrenta esta técnica, es el problema de la reproducibilidad, por lo que se hace necesaria una estricta estandarización de las condiciones de amplificación, así como llevar a cabo réplicas de todas las amplificaciones para una completa fiabilidad. Pese a estos inconvenientes, los RAPD constituyen una excelente herramienta para los estudios genéticos de poblaciones (Black, 1993).

3.4.2.1 Principio de la técnica de RAPD. El análisis RAPD se basa en la amplificación del ADN genómico con un cebador corto (diez bases) de secuencia elegida arbitrariamente, que se une a secuencias complementarias de ambas cadenas de ADN, lo que resulta en la amplificación de las regiones intermedias (Walker & Rapley, 2008). La

amplificación de la reacción procede en condiciones de baja severidad lo que permite la existencia de vinculación entre cebadores y ADN template a pesar de que dos secuencias totalmente complementarias no se produzcan. Como resultado, se produce un conjunto de fragmentos amplificados que varían en tamaño e intensidad y que cuando se separan por electroforesis en gel se produce un patrón de bandas específico conocido como fingerprinting (Walker & Rapley, 2008).

Para obtener perfiles claros en RAPD se requiere garantizar que la concentración del ADN sea la misma en cada muestra variando de 20 a 30ng por reacción. La amplificación en RAPD ya no es reproducible por debajo de esta concentración y produce ciertas "manchas" o los resultados en la resolución son pobres o puede haber inhibición con concentraciones altas de ADN (Bardakci, 2000). La concentración de ADN se puede determinar por comparación con muestras de concentración conocida a través de electroforesis en gel de agarosa entre el 0,8 y el 2% teñidas con bromuro de etidio o mediante espectrofotometría a 260-280nm con 10µl de ADN molde (Walker & Rapley, 2008).

La elección adecuada del conjunto de cebadores determinará el grado de reproducibilidad en la exploración del genoma donde sólo se utiliza una sola secuencia aleatoria de oligonucleótidos en condiciones de baja rigurosidad y sin conocimiento previo del genoma. Normalmente, algunos conjuntos deben ser probados de forma individual, para determinar qué iniciadores, en particular diferencian una especie de otra y los que muestran los patrones de bandas reproducibles deben ser utilizados para estudios genéticos de cada organismo (Walker & Rapley, 2008, Bardakci, 2000).

Los cebadores diseñados utilizados al azar poseen cada uno propias condiciones óptimas de reacción y reactivos (Bardakci, 2000). Las secuencias de los cebadores RAPD que generan el mejor patrón de ADN para la diferenciación debe ser determinada empíricamente. Por lo general, los marcadores RAPD son detectados por el uso de cebadores aleatorios decamericos con 50-80% de contenido de C G son los más adecuados, aunque depende del organismo de estudio (Bardakci, 2000; Walker & Rapley, 2008).

3.5 ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE INVESTIGACIÓN

Colletotrichum spp. es un patógeno que ocasiona muchas pérdidas económicas puesto que afecta una gran variedad de cultivos, razón por la cual numerosos estudios se han enfocado a su caracterización, sin embargo los trabajos en tomate de árbol en Colombia son pocos y no existe ninguno en los departamentos de Nariño y Putumayo. A continuación se presenta un breve resumen de los estudios que se han realizado de esta enfermedad en frutales:

Afanador, *et al.*, en el 2003 realizaron una caracterización morfológica y molecular de 54 aislamientos de *Colletotrichum* provenientes de tomate de árbol, 26 de curuba y 15 de mango, encontrando que, tomate de árbol está siendo infectado por *C. acutatum*, mango por *C. gloeosporioides* y curuba por *Colletotrichum* sp. y que esta población de aislamientos de *Colletotrichum* no presenta especificidad de hospedero.

Casarrubias y colaboradores, en el 2003, evaluaron la diversidad genética de 21 cepas monospóricas de *C. gloeosporioides* provenientes de frutos de papaya de tres regiones de México mediante la técnica RAPD, para lo cual usaron 18 oligonucleótidos decaméricos de secuencias aleatorias, obteniendo un dendrograma en el cual se observó la formación de dos grupos principales de cepas (A y B) ampliamente separados, con un valor de 100% de asociación entre los agrupamientos, el grupo A con características completamente diferentes al resto de los aislamientos agrupados en B, observándose una tendencia de acuerdo a su lugar de procedencia.

Álvarez y colaboradores (2005) identificaron y caracterizaron morfológica, genética y patogénicamente 54 aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de cultivos de guanábana en el Valle del Cauca. La caracterización se basó en morfología de colonia, patogenicidad y reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores específicos ITS, Calnt2 (*C. acutatum*) y CgInt (*C. gloeosporioides*), además realizaron corte con enzimas de restricción de la región ITS y evaluación de la diversidad genética mediante amplificación al azar de microsatelites (RAMs). Los resultados confirmaron la presencia de las dos especies y el análisis de RAMs mostro una gran variabilidad genética evidenciando la diversidad fenotípica y genética de *Colletotrichum* spp.

Cadavid, *et al.*, en el 2007, evaluaron 178 aislamientos de la colección nacional de *Colletotrichum* conformada por CORPOICA en el laboratorio de fitopatología en Tibaitatá (Bogotá, Colombia), originarios de lesiones de antracnosis en tres frutales hospederos, limón, tomate de árbol y mango, mediante el análisis de las regiones intergénicas del ADN ribosomal (ITS) mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) con cebadores específicos. Adicionalmente, caracterizaron la diversidad genética empleando marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic ADNs*) y AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). De los 178 aislamientos evaluados, 138 fueron identificados como *C. acutatum* y los 40 restantes como *C. gloeosporioides*. El análisis de similaridad calculado para RAPD y AFLP, mostró a un nivel de similaridad del 40 % y 51 % respectivamente, una separación clara de dos grupos, correspondientes a las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Con respecto al grupo de *C. acutatum* a un nivel de similaridad cercano al 60% se evidenciaron dos subgrupos pertenecientes a los hospederos de tomate de árbol y limón. Así mismo, para la especie *C. gloeosporioides* se formaron los subgrupos de los hospederos de mango y limón con una similaridad de 49 % para RAPD y 75 % para AFLP. Al interior de cada subgrupo, se observó una tasa de similaridad que osciló entre el 75 % y el 100 %, lo que tiende a indicar muy poca diversidad dentro de cada hospedero.

Alarcón *et al.*, en el 2007 realizaron un diagnóstico precoz de la antracnosis en tomate de árbol mediante la activación de infecciones quiescentes causadas por *C. gloeosporioides* en frutos y hojas; de la fruta sana recolectada en campo se indujeron infecciones quiescentes encontrando un 55% de infección por *C. gloeosporioides*. Se presentaron diferencias altamente significativas en los variables síntomas y signos en función del tiempo, con gran influencia del clima en la evolución de la enfermedad. Cuando la precipitación fue baja se observó una disminución sustancial del número de frutos enfermos, pasando posteriormente a un aumento gradual y significativo en períodos de alta precipitación. En general para todos los tratamientos se encontró que los tamaños de frutos preferentemente afectados son verde mediano y verde grande, en especial en períodos de aumento de la precipitación. Dicho comportamiento puede tener su origen en el nivel de inoculo presente en el cultivo al inicio de la investigación, encontrándose infecciones latentes o quiescentes que sólo se manifestaron en condiciones ambientales y fisiológicas favorables al patógeno.

Arenas *et al.*, en el 2007 realizaron la caracterización molecular y patogénica de 53 aislamientos de *Colletotrichum* spp., obtenidos a partir de plantas de mora afectadas en nueve municipios productores del Valle del Cauca. La identificación de las especies se realizó utilizando los cebadores específicos *CgInt* (*C. gloeosporioides*) *CaInt2* (*C. acutatum*) y *Col1* (*Colletotrichum* spp.) combinados con el cebador ITS4 y mediante el análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP). Se determinó la diversidad genética de la población por medio de la amplificación de cinco sistemas de microsatélites al azar (RAMS), y la prueba de patogenicidad se llevó a cabo mediante la implementación de inoculaciones de tallos de variedad susceptible en el laboratorio. Se determinó que el 19 % de los aislamientos correspondían a *C. acutatum* y el 81 % a *C. gloeosporioides*, la identificación de cada aislamiento fue confirmada mediante el análisis SSCP. El análisis de varianza molecular para RAMS mostró que el 19.18 % ($P < 0.001$) de la variación ocurría entre los municipios. El 91 % de los aislamientos de *C. gloeosporioides* mostró niveles de patogenicidad intermedio y alto, mientras que el 100 % de los aislamientos de *C. acutatum* mostraron un nivel de patogenicidad bajo y no patogénico. La mayoría de los aislamientos considerados como muy patogénicos provenían del municipio de Buga (29 %) y el aislamiento más patogénico fue identificado como *C. gloeosporioides* perteneciente al municipio de Buga.

Rojas *et al.*, en el 2007 caracterizaron 80 aislamientos de *Colletotrichum* spp., procedentes de 11 departamentos de Colombia, estableciendo su identidad taxonómica mediante cebadores específicos *CgInt* (*C. gloeosporioides*), *CaInt2* (*C. acutatum*) y *Col1* (*Colletotrichum* sp.), su diversidad genética por la técnica de amplificación aleatoria de microsatélites (RAMS), patogenicidad, velocidad de crecimiento *in vitro* y sensibilidad de extractos de fique, lixiviado de raquis de plátano (LRP) y fungicidas comerciales. El 67.05 % de aislamientos correspondieron a la especie *C. gloeosporioides*, 22.35% a una especie sin

identificar y 1.17 % a *C. acutatum*. *C. gloeosporioides*, aislamiento GM86, procedente del Meta fue el más patogénico ($r = 0.48$), asociándose alta patogenicidad a esta especie. Los aislamientos identificados como *Colletotrichum* sp., fueron de patogenicidad media a baja y *C. acutatum* de patogenicidad baja ($r = 0.04$).

Saldarriaga *et al.*, en el 2008 realizaron un estudio con el fin de contribuir a la caracterización del agente causante de la Antracnosis, en huertos comerciales de tomate de árbol, manzana y mora ubicados en Antioquia y Caldas. Los aislamientos del hongo se probaron en su patogenicidad y se caracterizaron morfológicamente mediante color de los aislamientos, tasa de crecimiento, aspecto del micelio, tamaño y forma de las conidias. La caracterización morfológica se complementó mediante diagnóstico molecular usando oligonucleótidos específicos para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* y protocolos ajustados. Se encontró, alta variabilidad dentro y entre los aislamientos en las características morfológicas, así como inestabilidad de los rasgos fenotípicos a medida que los aislamientos crecían en medio de cultivo, lo que no fue suficiente para un claro establecimiento de patrones de diferenciación entre aislamientos. El análisis molecular permitió determinar al hongo *C. acutatum* como agente causante de la Antracnosis en estos frutales. La técnica permitió diferenciar *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. La estandarización de la técnica molecular es un aporte básico para continuar estudios en el complejo *Colletotrichum* en los frutales de clima frío moderado.

El grupo de investigación Genética y Evolución de Organismos Tropicales, GENPAT (Sexto informe MADR, agosto 2011), estableció que aislamientos de *Colletotrichum* spp. procedentes de tomate de árbol de los departamentos de Nariño y Putumayo exhiben gran variabilidad en las características morfológicas, especialmente color, aspecto y tipo de micelio, caracteres que presentan una alta plasticidad, por lo que no son confiables para la diferenciación de los aislados de *Colletotrichum*, no obstante los aislados fueron afines a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS

Los aislamientos monosporicos utilizados para este estudio fueron tomados del cepario de micología de la Universidad de Nariño a cargo del grupo Genética y Evolución de Organismos Tropicales – GENPAT, los cuales se encuentran conservados en agua destilada estéril a temperatura ambiente (14°C). Para la amplificación de la región ITS se trabajó con todos los aislamientos de *Colletotrichum* spp del cepario (75 provenientes del departamento del Putumayo y 33 aislamientos provenientes del departamento de Nariño). Para el análisis de variabilidad genética mediante marcadores RAPDs y para las pruebas de patogenicidad se seleccionó una muestra representativa (50 aislamientos de *Colletotrichum* spp provenientes del departamento de Putumayo y 25 provenientes del departamento de Nariño) (Anexo 1 y 2), teniendo en cuenta estudios previos realizados a estos aislamientos sobre su variabilidad genética mediante el uso de morfometría tradicional y geométrica (Estrada y Lagos, 2010), y su sensibilidad a fungicidas (Burbano *et al.*, 2011, Estrada *et al.*, 2011).

4.2 ESTUDIO MOLECULAR

Para la obtención de micelio de *Colletotrichum* spp. para las diferentes pruebas moleculares se sembró cada aislamiento en caldo papa suplementado con peptona y sacarosa (200g papa, 4g peptona, 8g sacarosa, 1000ml agua destilada). De cada aislamiento se sembraron cinco repeticiones, las cuales se dejaron crecer entre ocho y diez días a temperatura ambiente, posteriormente, el micelio fue secado con papel filtro estéril, macerado con nitrógeno líquido y almacenado en tubos Falcon de 15ml a -20°C.

4.2.1 Extracción de ADN. Para la extracción de ADN se probaron los siguientes protocolos en cuatro aislamientos de *Colletotrichum* spp:

Protocolo de Extracción de ADN (CIP) (Ordoñez *et al.*, 2000)

- A partir de micelio seco y macerado con anterioridad, se pesaron 35mg de cada muestra, se agregó 1ml de buffer de extracción (0.05M EDTA pH 8.0; 0.1M Tris base pH 8.0; 0.7% β -mercaptoetanol; 0.25% SDS; 0.5M NaCl) y se incubó durante una hora a 65°C.
- Se adicionaron 333 μ l de acetato de potasio 5M, se agitó vigorosamente hasta homogeneizar la muestra y se colocaron en hielo durante 20 minutos.
- Se centrifugó por 1 minuto a 16000 gravedades y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf.

- Se precipitó el ADN con 800µl de isopropanol y se guardaron los tubos a -20°C por 1 hora.
- Se centrifugó a 16000 gravedades por cinco minutos, se eliminó el sobrenadante, se secó el pellet durante una hora y se resuspendió en 100µl de TE 1X.

Protocolo de extracción de ADN de Hongos. Universidad Nacional de Palmira.

- Se maceró el micelio con nitrógeno líquido hasta obtener alrededor de 100mg por cada aislamiento.
- Se adicionaron 400µl de buffer CTAB 2X (CTAB 2% (p/v), 100mM Tris HCl pH 8.0, 1.4M de NaCl, 20mM EDTA pH 8.0, y se incubaron los tubos eppendorf a 65°C durante media hora.
- Se agregó un volumen de fenol:cloroformo (1:1) y se mezcló por inversión durante diez minutos.
- Se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos (este procedimiento de separación de proteínas, se repitió dependiendo del grado de pureza del sobrenadante).
- Se precipitó el sobrenadante en dos volúmenes de etanol absoluto frío y 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio 3M.
- Se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos.
- El pellet generado fue lavado con etanol al 70%, y resuspendido en 100µl de agua destilada estéril.
- El ARN fue digerido mediante la adición de 10µl de ARNasa (10mg/ml) e incubación a 37°C durante doce horas.
- Se almacenó a -20°C.

Protocolo de Gorge Mahuku modificado por Álvarez *et al.* (2005).

- Se adicionaron 900µl de buffer de extracción (NaCl 1,4M, 20mM de EDTA, 100mM Tris HCl pH 8,0) y 1,5µl de proteinasa K (10mg/ml), se mezcló en un agitador tipo vortex y se incubó a 65°C por una hora.
- Se adicionaron 200µl de acetato de amonio 7,5M y se mantuvo a temperatura ambiente por diez minutos.
- Se centrifugó a 12500 rpm por 20 minutos, se recuperó el sobrenadante y se adicionó un volumen igual de Cloroformo: Isoamil (24:1) y se mezcló por inversión.
- Se centrifugó a 12500 rpm durante diez minutos, se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf, se adicionó 1/3 del volumen de isopropanol frío y se conservó a -20°C durante toda la noche.
- Se centrifugó a 12500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 350µl de etanol frío.
- Se centrifugó a 12000 rpm por cinco minutos, se descartó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 50µl de buffer TE.

Protocolo de extracción directo Griffith Gareth y Shaw David (1998).

- Se agregaron 800µl de buffer de extracción CTAB (NaCl 1.4M, EDTA pH 8.0 20mM, Tris HCl pH 8.0 100mM, CTAB 2 %) y se incubó por una hora a 65°C.
- Se adicionaron 600µl de cloroformo y se realizó vortex por diez segundos.
- Se centrifugó a 17000 gravedades durante diez minutos, se tomaron 600µl de la fase superior y se transfirieron a un tubo nuevo.
- Se adicionaron 0,6 volúmenes de isopropanol frio (60µl por cada 100µl), se agitó con vortex y se dejó en posición vertical a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se centrifugó a 17000 gravedades por 10 minutos, y se eliminó el sobrenadante.
- El pellet fue lavado con un mililitro de etanol al 70%, se agitó y se dejó a 65°C durante 20 minutos.
- Se centrifugó a 17000 gravedades por diez minutos y se dejó a temperatura ambiente durante el tiempo suficiente para remover cualquier traza de etanol.
- Se resuspendió en 200µl de TE 1X, se agregaron 3µl de ARNasa (10 mg/ml) y se dejó durante 2 horas a 37°C, finalmente se almacenó a -20°C.

La integridad del ADN extraído se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,9%, teñido con 3µl de Bromuro de Etidio (10mg/ml). Las bandas se visualizaron en un fotodocumentador marca Benchtop UV Transiluminator (UVP) y se analizaron en el software Doc-it®LS Image Analysis Software versión 6.7.1.

El protocolo que se utilizó para todas las pruebas fue aquel a partir del cual se obtuvo ADN de buena calidad, lo cual se verificó mediante la integridad de las bandas, y una concentración igual o superior a 50ng, la cual se determinó mediante la comparación de las bandas con un ADN λ de concentración conocida (25ng).

4.2.2 Amplificación de la región ITS. Para la identificación de las especies de *Colletotrichum* se trabajó con los los siguientes cebadores:

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la amplificación de las regiones ITS.

Nombre cebador	Secuencia (5'->3')	Referencia	Comentario
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990	Cebador universal
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White <i>et al.</i> , 1990	Cebador universal
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990	Cebador universal
CgInt	GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG	Brown <i>et al.</i> , 1996; Martin, <i>et al.</i> , 2002; Afanador <i>et al.</i> , 2003	Cebador específico para <i>C. gloeosporioides</i>
CaInt2	GGGGAAGCCTCTCGCGG	Brown <i>et al.</i> , 1996; Martin, <i>et al.</i> , 2002; Afanador <i>et al.</i> , 2003	Cebador específico para <i>C. acutatum</i>

Para la PCR se utilizó el protocolo propuesto por Álvarez *et al*, en el 2005 (Tabla 3). Las condiciones de amplificación consistieron en 25 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94°C por 30 segundos (120 segundos para la inicial), 55°C por 30 segundos de apareamiento y una extensión de 120 segundos a 72°C (240 segundos para la final) para todos los cebadores.

Tabla 3. Mezcla maestra para la amplificación de la región ITS.

Reactivo	Concentración final
Buffer Taq 10X (100mM de Tris HCl, pH 8.0, 2.5mM MgCl₂ y 500mM KCl)	1X
dNTPs,	0.2mM
Primer	0.5µM
MgCl₂	1.5mM
Taq polimerasa	0.0375U/µL
Agua HPLC	-
ADN	2ng/µL

Para visualizar los amplificados se utilizaron geles de agarosa al 1.4% teñidos con bromuro de etidio. Las bandas de los amplificados fueron observadas en un fotodocumentador marca Benchtop UV Transiluminator (UVP) y se analizaron en el software Doc-it®LS Image Analysis Software versión 6.7.1. Se utilizó un control positivo obtenido de la amplificación de ADN de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* proveniente de cepas ya caracterizadas a nivel molecular y facilitadas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y un control negativo de reacción (mezcla maestra sin ADN). Para estimar el tamaño de los productos amplificados se empleó un patrón de peso molecular 1kb ADN Ladder 5 x 50µg.

4.2.3 Análisis de variabilidad genética mediante marcadores RAPDs. La reacción de RAPDs se llevó a cabo usando nueve oligonucleótidos decaméricos de secuencias al azar (Tabla 4) comercializados por Operon Technologies (Alameda, CA, USA) de 60 – 70% de CG de la serie D (3), AN (3), AD (2) y BA (1), los cebadores se utilizaron en reacciones individuales para la amplificación de 75 aislamientos de *Colletotrichum* spp. Sin embargo mediante este método el patrón de bandas no fue significativo para ser analizado por lo tanto se optó por evaluar 18 combinaciones de pares de cebadores (Tabla 5).

Tabla 4. Características de los oligonucleótidos (Operon Technologies, Inc.) utilizados para determinar la variabilidad genética de 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum*.

Código del primer	Secuencia (5' →3')	Peso molecular (g/mol)*	Contenido de C + G (%)*	T° de fusión*
OPD-01	ACC GCG AAG G	3062,05	70	34 °C
OPD-02	GGA CCC AAC C	2981,99	70	34 °C
OPD-03	GTC GCC GTC A	3004,00	70	34 °C
OPAD-08	GGC AGG CAA G	3102,08	70	34 °C
OPAD-02	CTG AAC CGC T	2988,00	60	32 °C
OPAN-08	AAG GCT GCT G	3068,06	60	32 °C
OPAN-19	ACC ACG CCT T	2947,97	60	32 °C
OPAN-20	GAG TCC TCA C	2988,00	60	32 °C
OPBA-08	CCA CAG CCG A	2981,99	70	34 °C

*El peso molecular, el contenido de C + G y la temperatura de fusión fueron calculados con el programa Khirshyat 1.0 for molecular Biology Protocols, 2010. Datos que proporcionaron un punto de partida para la determinación de las temperaturas de alineamiento y extensión óptima.

Tabla 5. Combinaciones de pares de cebadores RAPDs utilizadas.

CÓDIGO	COMBINACIONES DE CEBADORES	CÓDIGO	COMBINACIONES DE CEBADORES
A*	OPD 01 / OPBA 08	K	OPAN 19 / OPAN 20
B	OPD 02 / OPBA 08	M*	OPAN 19 / OPD 02
C	OPD 03 / OPBA 08	N	OPAN 20 / OPD 02
D*	OPD 01 / OPD 02	R	OPD 01 / OPAN 19
E*	OPD 01 / OPD 03	S	OPBA 08 / OPAN 19
F	OPD 02 / OPD 03	T	OPAN 08 / OPBA 08
H*	OPAN 08 / OPAN 19	W*	OPAN 08 / OPD 02
I	OPAN 08 / OPAN 20	X*	OPAN 08 / OPD 03
J*	OPAN 08 / OPD 01	Z*	OPAN 19 / OPD 03

*Combinaciones de cebadores que fueron analizadas en este estudio.

Se amplificó un volumen de reacción de 15µl para cada una de las muestras, usando los reactivos, concentraciones y cantidades indicadas en la tabla 6, para cada oligonucleótido se preparó una mezcla con todos los reactivos (excepto el ADN) en la cantidad necesaria para lograr 28 reacciones, posteriormente se transfirieron 10 µl de la mezcla a cada uno de los tubos de PCR, finalmente se agregó 5µl de ADN [≈25ng/µl]. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un Termociclador Nyx Technik Amplytronix Serie 6 en el laboratorio de biología molecular de la Universidad de Nariño. Debido a que en diferentes artículos las condiciones de amplificación reportadas variaron, se optó por seguir las ejecutadas por Lardner y colaboradores (1999) quienes modificaron el protocolo de Williams y colaboradores (1990) para *C. acutatum*. Las condiciones de amplificación para todos los cebadores RAPDs consistieron en la desnaturalización inicial a 95°C por cinco

minutos, seguido por una amplificación exponencial de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante un minuto, hibridación a 36°C durante un minuto, extensión a 72°C durante un minuto 30 segundos y un ciclo de extensión final a 75°C durante siete minutos para asegurar la extensión completa de los productos. En cada reacción se montó un control positivo para *C. acutatum* (V064), un control alterno correspondiente a *C. gloeosporioides* (V016) y un control negativo de reacción (sin muestra de ADN) para registrar posibles agentes contaminantes que pudieran indicar falsos positivos.

Tabla 6. Reactivos, concentraciones y cantidades utilizadas para la amplificación de muestras de ADN mediante la técnica RAPDs.

Reactivos	Concentración Final	Cantidad 1 cebador (µl)	Cantidad 2 cebadores (µl)
Go Taq™ Reaction Buffer 10 X (M3005 de 500 u)	1 X	3	3
DNTPs	0.4 mM	2.4	2.4
MgCl₂	3 mM	0.9	0.9
1 Primer	1 uM	0.75	0.75
2 Primer	1 uM	-	0.75
Taq ADN Polimerasa (recombinant) x 500units	1 U	0.18	0.18
ADN genómico de <i>C. acutatum</i>	≈25 ng	5	5
Agua estéril libre de nucleasas	-	2.77	2.02
Volumen final		15 µl	15 µl

La separación de los productos amplificados se realizó en cámara de electroforesis horizontal, las muestras fueron separadas en geles de agarosa (Agarose Biotechnology Grade, AMRESCO) al 1.4% preparados con buffer TBE al 1% teñidos con 3µl de bromuro de etidio (0.5 mg/ml), los cuales se dejaron correr a 100 V por 2 horas y 30 minutos, usando tampón TBE al 1X. En cada gel se sembró en el primer pozo 8µl de GeneRuler™ 100 bp Plus ADN Ladder (100-3000bp) marca Fermentas la cual permitió dimensionar y cuantificar de manera aproximada los productos amplificados, en los 25 pozos siguientes se sembraron 8µl de cada muestra amplificada mas 3µl de buffer de carga (azul de bromofenol) y en los tres últimos pozos se montaron los controles. Para la visualización se utilizó un DigiDoc - sistema de imágenes UVP con transiluminador incorporado, la imagen fue capturada mediante un registrador de imágenes (Life Science Software UVP) y almacenada en un equipo para su posterior análisis.

4.2.3.1 Análisis de datos. Los perfiles de bandas obtenidos se analizaron mediante observación visual, acorde a los criterios descritos por Tenover *et al.* (1997 y 1995), según los cuales, se debe considerar como indistinguibles, aquellos aislamientos que no presenten diferencias en ninguna de las bandas; *cercanamente relacionadas*, las que

presenten 2 ó 3 fragmentos diferentes; *posiblemente relacionadas* a los aislamientos con diferencias en 4 a 6 fragmentos de ADN (bandas); mientras que aquellas con 7 ó más fragmentos diferentes, son consideradas como *no relacionadas*, generando una cuadrícula sobre la imagen a partir de los tamaños del marcador de peso molecular utilizando la aplicación informática CorelDRAW X5.

Las bandas fueron numeradas en relación con su migración en orden ascendente según su tamaño molecular. Se realizó un Análisis de Clúster por combinación de cebadores y por región (Nariño y Putumayo) mediante la construcción de una matriz binaria y/o matriz básica de datos (MBD) generada en EXCEL 2007 basada en la presencia/ausencia. Se asignó el valor numérico 1 para expresar la presencia de una banda y de 0 para la ausencia, asumiendo que los fragmentos amplificados de la misma combinación en diferentes individuos son idénticos si tienen el mismo peso molecular.

La información obtenida de cada combinación se utilizó para calcular una matriz de similitud, inicialmente, se calcularon las matrices de distancia genética con tres coeficientes de similitud (Concordancia Simple, Jaccard y Sorensen-Dice) para obtener el mejor estimador de semejanza para las poblaciones de *C. acutatum*. Se eligió el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908) debido a que presentó los coeficientes cofenéticos más elevados (Tenover *et al.*, 1995, Kosman *et al.*, 2005), porque describe el grado de asociación entre los elementos comparados expresado en valor numérico, entre 0 y 1, por ser el más simple entre los de su clase y por ser ampliamente utilizado para el análisis con marcadores dominantes, debido a que excluye las co-ocurrencias negativas justificando su utilización cuando se comparan organismos estrechamente relacionados (Landry & Lapoint, 1996, Meyer *et al.*, 2009); este coeficiente se calculó en el programa SIMQUAL del paquete informático "Numerical Taxonomy System for Personal Computer" NTSYSpc versión 2.11f (software Exeter, Nueva York, Rohlf, 2000). A partir de las matrices de similitud se construyeron los dendrogramas utilizando el método UPGMA por medio del programa SAHN del paquete NTSYSpc.

Posteriormente se construyó una matriz de similitud consenso mediante la agrupación de los datos, para determinar la diversidad genética entre los aislamientos de *C. acutatum*. Finalmente, se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para subdividir la variación genética total entre y dentro de los grupos seleccionados con base a la matriz consenso, mediante el software integrado para el análisis de datos de Genética de Poblaciones ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer, 2010), se verificó la posible diferencia estadística entre las poblaciones de Nariño y Putumayo mediante el estadístico F_{TS} .

4.3 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

4.3.1 Selección de genotipos. Se evaluaron en total once genotipos de tomate de árbol provenientes del municipio de Santiago (Putumayo) (Anexo 3). Para su selección se tuvieron en cuenta características morfológicas y fisiológicas del fruto tales como diámetro, peso, sólidos solubles totales medida en grados brix en campo a la cosecha y acidez titulable, datos con los cuales se realizó un fenograma de agrupamiento por el método UPGMA en el programa NTSYSpc 2.1. Para realizar las pruebas de patogenicidad se seleccionaron genotipos de cada grupo formado en el clúster con el fin de abarcar la mayor variabilidad posible. Se utilizó un testigo que consistió en un genotipo comercial de tomate de árbol al cual se le realizó el mismo tratamiento que a los otros genotipos. De cada genotipo se seleccionaron frutos en dos estados de madurez: inmaduro (Figura 3, estado de madurez 0) y pintón (Figura 3, estado de madurez 2), según la norma técnica Colombiana para tomate de árbol NTC 4105.



Figura 3. Cambios de color de los frutos de tomate de árbol según su estado de madurez. Fuente: Norma Técnica Colombiana para tomate de árbol.

Para la determinación de sólidos solubles totales se realizó una dilución de pulpa en agua destilada 1:3 p/p, se midió la solución con un refractómetro y el dato obtenido se multiplicó por el factor de dilución con el fin de obtener los grados Brix.

Para la determinación de la acidez titulable, se realizó una dilución de pulpa 1:10 p/v filtrada la cual se tituló con NaOH 0,1N hasta obtener un pH de 8,2 y viraje a color rosado con fenolftaleína. El porcentaje de ácido cítrico se evaluó mediante la ecuación:

$$\% \text{ Acido cítrico} = (100 \times V1 \times N \times \text{meq}) / V$$

Donde, V1 = ml de NaOH; meq = 0,064 de ácido cítrico; N = normalidad de NaOH; V = Volumen de la dilución.

4.3.2 Selección y reactivación de aislamientos. Para éstas pruebas, se partió de los aislamientos que se encuentran conservados en agua a temperatura ambiente (14°C), los

cuales fueron reactivados en frutos sanos de tomate de árbol y purificados nuevamente. Para el aislamiento del patógeno se utilizó como medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) marca OXOID. De cada muestra infectada se cortaron pequeños fragmentos de tejido de tal manera que cada fragmento tuviera una parte sana y otra enferma, se lavaron con Etanol al 70% durante cinco segundos, y por cada caja de Agar Papa Dextrosa (PDA) se sembraron dos fragmentos; cada muestra se sembró por triplicado y se incubó a temperatura ambiente (14°C) durante ocho días.

Después se realizó la purificación del patógeno, tomando un pequeño fragmento del cultivo correspondiente a las características macroscópicas de *Colletotrichum* (Estrada y Lagos, 2011) y se transfirió a un nuevo medio de cultivo PDA, se incubó a temperatura ambiente (14°C) durante ocho días.

Para la inoculación de los frutos de tomate se realizaron mezclas de los aislamientos teniendo en cuenta su origen geográfico (Tabla 7 y 8, Anexo 1 y 2) y, se preparó una suspensión 1×10^6 conidias, con la cual se inocularon los frutos de tomate de árbol de los genotipos seleccionados. Para la mezcla se utilizaron aislamientos de diez días de crecimiento.

Tabla 7. Origen de los aislamientos provenientes del departamento de Putumayo

Mezcla	Código de los aislamientos	Municipio	Parte infectada de la planta		
			Fruto	Tallo	Hoja
1	P8003 - P8013 - P8026 - P8050 - P8077 - P8086 - P8088 - P8097	Santiago	X		
	P8004 - P8047 - P8083	Santiago			X
	P8063 - P8094 - P8096	Santiago		X	
2	P8020 - P8022 - P8023 - P8024 - P8025 - P8074 - P8076 - P8078 - P8082	Colón	X		
	P8070 - P8072	Colón			X
3	P8098 - P9127 - P9150 - P9168	San Francisco			X
	P8109 - P9117 - P9133 - P9137 - P9148 - P9151 - P9160	San Francisco	X		
	P9115 - P9118	San Francisco		X	
		San Francisco			
4	P9111 - P9146 - P9171 - P9172 - P9175 - P9184 - P9185 - P9187 - P9190 - P9192	Sibundoy	X		
	P9112 - P9179	Sibundoy			X

Tabla 8. Origen de los aislamientos provenientes del departamento de Nariño

Mezcla	Código de los aislamientos	Municipio	Parte infectada de la planta		
			Fruto	Tallo	Hoja
1	N8011	Pasto			X
	N8012 - N8017	Pasto	X		
2	N9047 - N9052 - N9083 - N9088	Buesaco			X
	N9048 - N9057 - N9067 - N9080	Buesaco	X		
3	N9096 - N9097 - N9098	Iles	X		
4	N9256 - N9271	La Unión			X
	N9261	La Unión	X		
5	N9276 - N9278 - N9285 - N9292 -	Córdoba	X		
	N9293 - N9295				
	N9281 - N9286	Córdoba			X

4.3.3 Inoculación de genotipos. Cada fruto fue lavado con agua corriente, luego se desinfectó durante un minuto con hipoclorito de sodio al 2%, se enjuagó con agua destilada estéril, y se secó sobre papel toalla a temperatura ambiente (14°C), finalmente se inoculó con la suspensión de conidias agregando una gota de 100µl. Para esto se realizaron pequeñas heridas mediante pinchazos con una aguja fina estéril, en un área de la zona ecuatorial e inmediatamente se procedió a la inoculación (Saldarriaga, 2006).

Después de inoculados, los frutos fueron colocados en cámaras húmedas a temperatura ambiente (14°C). Los tratamientos se revisaron diariamente con el fin de detectar y registrar la presencia de síntomas de antracnosis. Las variables registradas fueron tiempo transcurrido para la manifestación de síntomas iniciales de antracnosis, aparición de masas conidiales, tamaño de lesiones, evaluado como área de crecimiento de la lesión en mm², área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC), porcentaje de infección ((Número de frutos infectados/número de frutos inoculados) x 100) y tasa de esporulación (número de conidias producidas por unidad de área de lesión 15 días después de la inoculación) la cual se evaluó mediante el lavado de las lesiones con un mililitro de agua estéril y el conteo de esporas en la solución resultante usando una cámara neubauer bajo el microscopio en aumento de 40X ,

El registro de tamaño de lesión se realizó mediante fotografías tomadas con cámara Canon A470 en 3MP colocando una regla junto a los tomates inoculados para establecer la escala de medición. Las fotografías fueron procesadas mediante el programa Adobe Photoshop CS Versión 8.0.1 donde obtuvo el contorno de la lesión, posteriormente se calculó el área de los contornos usando el programa ImageJ 1.39o de 2008 que permite dar la escala de medida a partir de la regla fotografiada junto a los frutos inoculados (Figura 4). A partir de las áreas obtenidas se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad AUDPC, utilizando la siguiente fórmula:

$$AUDPC = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} \left[\left(\frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) \right]}{d}$$

donde: Y_i = área de la lesión en la i -ésima observación; t_i = tiempo (días) después de la i -ésima observación; n = número total de observaciones; d = total de días de evaluaciones (Juárez, 2002).

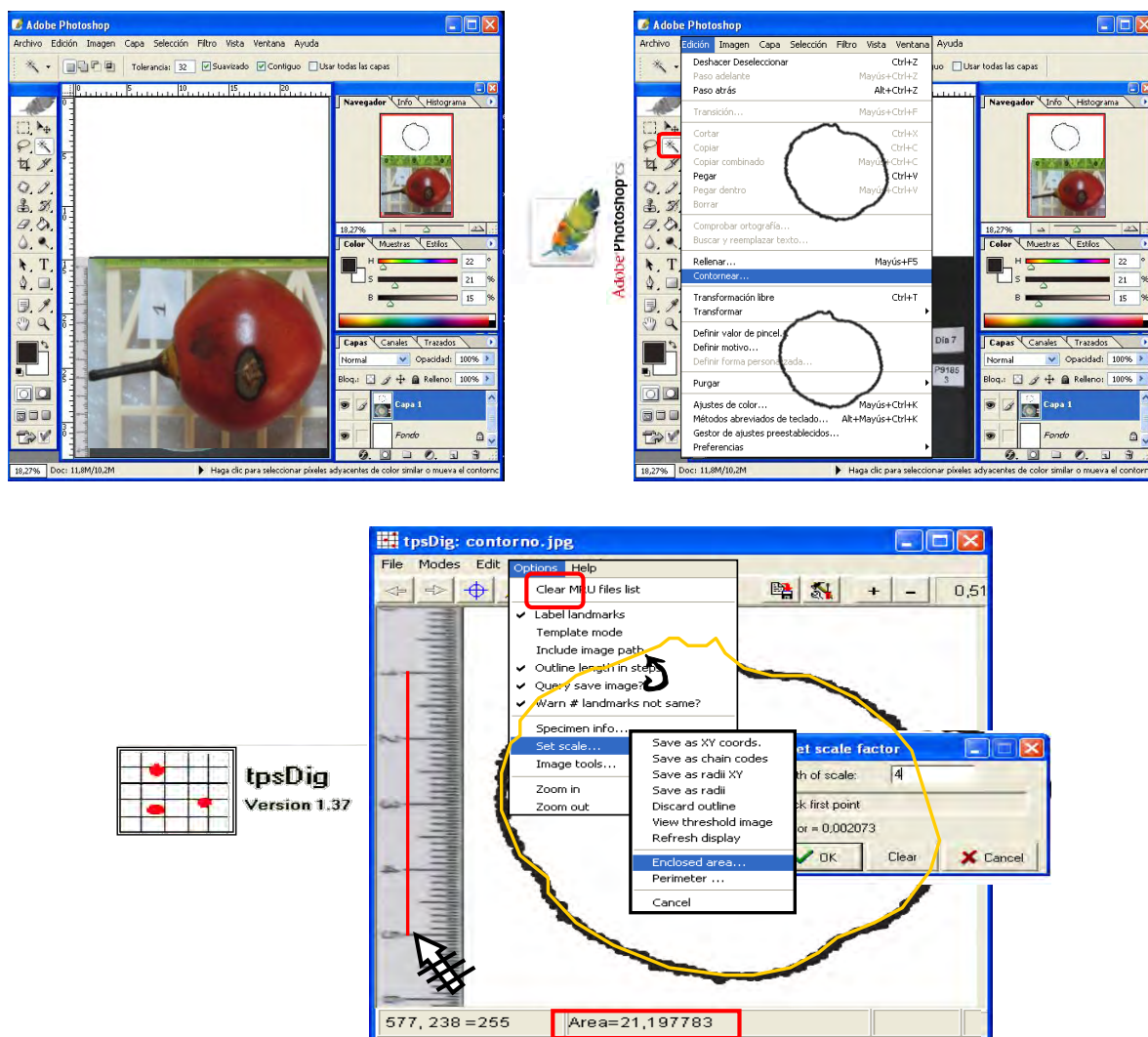


Figura 4. Metodología de obtención de tamaño de lesiones de los aislamientos de *Colletrichum* spp de Nariño y Putumayo.

Los resultados obtenidos fueron analizados en el paquete estadístico Statistical Analysis System - SAS, se realizaron pruebas de varianza para cada una de las variables registradas en frutos pintones y verdes, con el fin de establecer si existían diferencias significativas

entre genotipos y entre mezclas de aislamientos y finalmente se construyeron fenogramas de agrupamiento por mezcla de aislamiento en el programa SIMQUAL del paquete informático "Numerical Taxonomy System for Personal Computer" NTSYSpc versión 2.11f (software Exeter, Nueva York, Rohlf, 2000).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIO MOLECULAR

5.1.1 Medio de cultivo. El medio de cultivo (caldo Papa suplementado con peptona y sacarosa) utilizado para la obtención del micelio en el laboratorio para las pruebas moleculares permitió el óptimo crecimiento del hongo, el cual cubrió entre el 80 y 100% de la superficie del medio al cabo de ocho días bajo condiciones del laboratorio (Figura 5), el porcentaje de contaminación fue muy bajo alrededor del 5%, lo cual permite asegurar que este medio de cultivo es el adecuado para el crecimiento de *Colletotrichum* spp. proveniente de tomate de árbol. En total se cultivaron 103 aislamientos de *Colletotrichum* spp., 33 provenientes del departamento de Nariño y 70 del Putumayo y dos aislamientos usados como controles positivos en los diagnósticos moleculares, uno correspondiente a *Colletotrichum acutatum* (V064) y el otro correspondiente a *Colletotrichum gloeosporioides* (V016).



Figura 5. Crecimiento de los aislamientos MN9048 y MN9278, en caldo papa suplementado con peptona y sacarosa.

El género *Colletotrichum* es un complejo heterogéneo de especies que lo hace responder de manera variable a condiciones de crecimiento y desarrollo en diferentes medios de cultivo (Orozco *et al.*, 2004) y que exhibe dos fases principales de nutrición durante la colonización de la planta: la fase inicial biotrófica que se caracteriza por ser de corta duración, porque la expresión enzimática para degradar la pared vegetal está estrictamente limitada y la planta hospedera parece no reconocer al patógeno asegurándose el establecimiento de éste sin daños severos en el tejido vegetal; y la segunda fase tardía necrotrófica donde los alimentos se obtienen de las células hospederas muertas a causa del ataque del patógeno y hay un incremento en la expresión enzimática para degradar la pared celular vegetal (Bailey *et al.*, 1992). El crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum* spp. presenta algunas similitudes con el desarrollo necrótrofo, en lo que se refiere a la expresión enzimática (Shih *et al.*, 2000), la rápida colonización y utilización de la fuente de alimento y la producción de amonio

incrementando el pH hasta obtener el nivel óptimo para la actividad pectato liasa (pH 8.5) (Mendgen y Hahn, 2000).

5.1.2 Extracción de ADN. Para la extracción de ADN se probaron los cuatro protocolos descritos en el diseño metodológico con cuatro aislamientos de *Colletotrichum* spp., obteniendo resultados positivos con el protocolo de extracción directa Griffith Gareth y Shaw David (1998) y con el protocolo de Gorge Mahuku modificado por Álvarez *et al.* (2003) (Figura 6). Con los dos protocolos se obtuvo ADN de buena calidad, sin embargo para la extracción de ADN de los diferentes aislamientos se escogió el protocolo de extracción directa de Griffith Gareth y Shaw David, 1998 debido a que en este se emplea menos tiempo (cinco horas aproximadamente) en comparación con el protocolo de Gorge Mahuku modificado (16 horas).

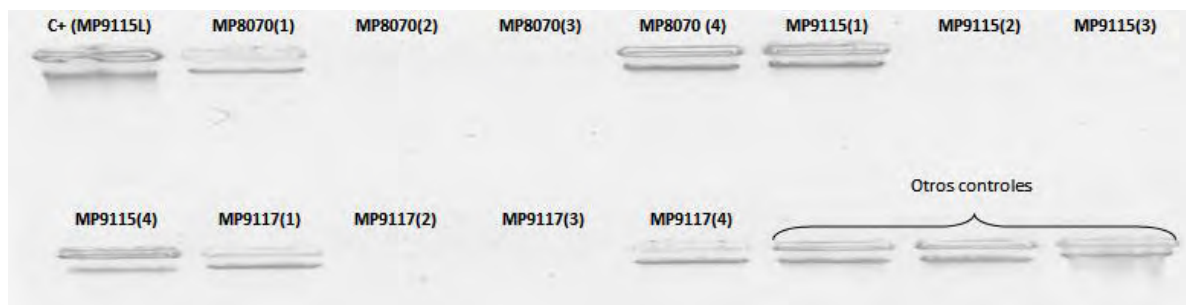


Figura 6. Gel de electroforesis en agarosa de 4 aislamientos de *Colletotrichum* spp. de Tomate de árbol proveniente del Valle de Sibundoy (Putumayo). El número entre paréntesis indica el protocolo utilizado, 1: protocolo de Gorge Mahuku modificado por Álvarez *et al.*, 2005, 2: protocolo de Ordoñez, 2000, 3: protocolo universidad Nacional sede Palmira, 4: protocolo de extracción directa Griffith Gareth, Shaw David, 1998.

Las concentraciones de ADN obtenidas en la extracción fluctuaron entre 50 y 200 ng cantidad suficiente para la realización de las pruebas moleculares posteriores. Como se observa en la figura 7 el ADN extraído fue de buena calidad lo que se verifica al evidenciarse una sola banda que indica que éste no se encuentra degradado. Además, el proceso de degradación de ARN se llevó a cabo de forma correcta ya que ninguna de las muestras presentó un barrido en la parte baja del gel que indique presencia de éste ácido nucleico.

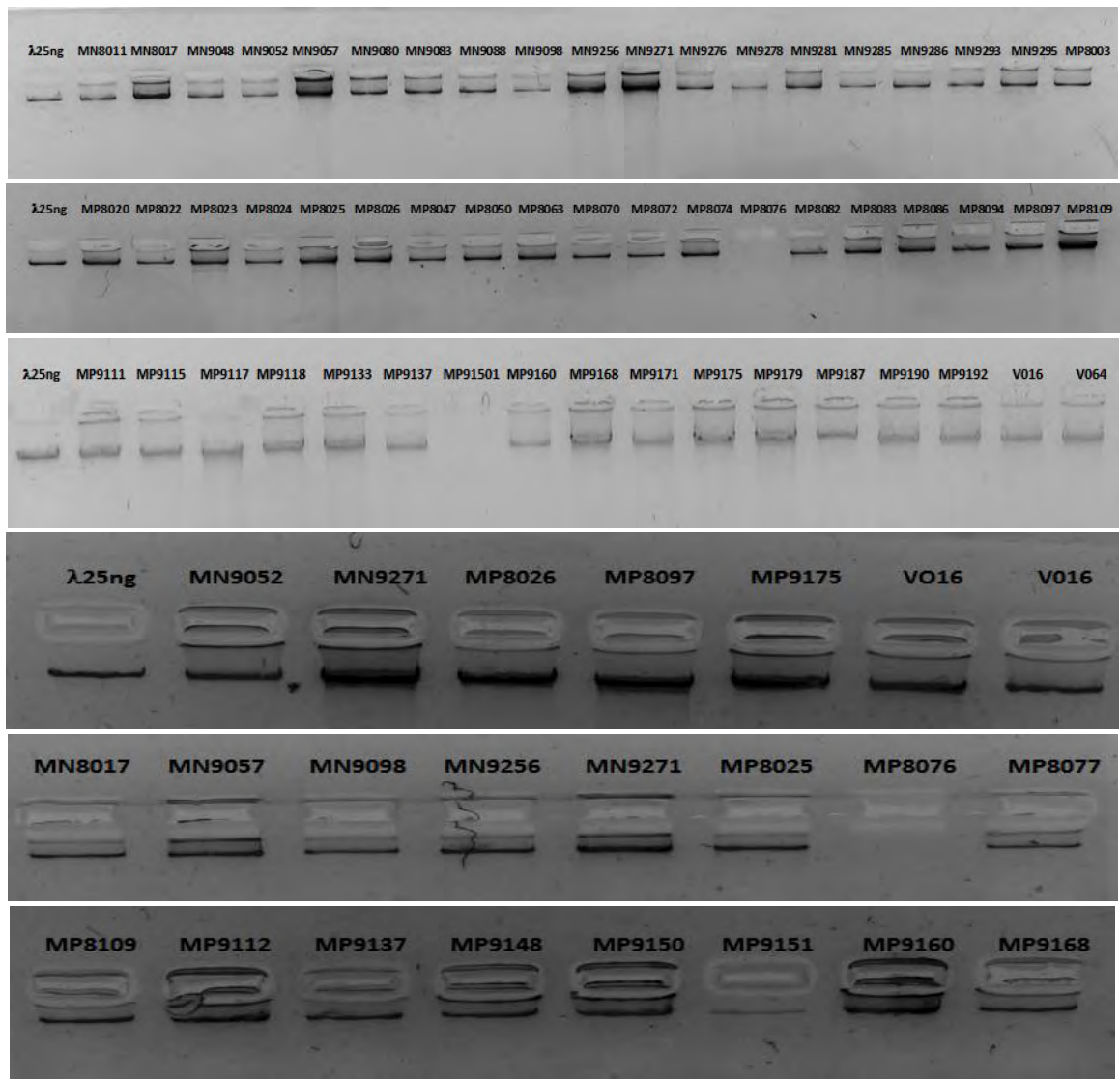


Figura 7. Gel de electroforesis en agarosa de ADN diluido de 75 aislamientos de *Colletotrichum* spp. de cultivos de tomate de árbol del Valle de Sibundoy (Putumayo) y del departamento de Nariño.

5.1.3 Amplificación de la región ITS

5.1.3.1 Optimización del protocolo de amplificación de la región ITS. Todos los aislamientos usados en este estudio fueron amplificados usando cebadores específicos para *Colletotrichum acutatum* y para *Colletotrichum gloeosporioides*, obteniéndose un fragmento amplificado de ADN de 490pb con los cebadores *Calnt2* + ITS4 para la especie *C. acutatum* y de 450pb para *C. gloeosporioides* usando los cebadores *CgInt* + ITS4.

El protocolo utilizado para la amplificación de la región ITS dio resultados positivos con los cebadores universales ITS1 e ITS2 en combinación con ITS4 y con el primer específico para *Colletotrichum acutatum* (Calnt2 + ITS4) (Figura 7), pero presentó inespecificidad con el cebador específico para *Colletotrichum gloeosporioides* (CgInt + ITS4) (Figura 8).



Figura 8. Amplificación de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de tomate de árbol del Valle de Sibundoy (Putumayo) y del departamento de Nariño con los cebadores universales ITS1, ITS2 e ITS4 y con los cebadores específicos CgInt (específico para *Colletotrichum gloeosporioides*) y Calnt2 (específico para *Colletotrichum acutatum*)

Al repetir la amplificación con el cebador específico para *Colletotrichum gloeosporioides* (CgInt + ITS4) en las mismas condiciones establecidas se volvieron a obtener bandas inespecíficas (Figura 8), por lo tanto se decidió probar modificando la temperatura de alineamiento y dejando las demás condiciones constantes. Se realizó una PCR en gradiente con tres aislamientos de Putumayo (MP9151, MP8095 y MP9190), en la cual se probaron las siguientes temperaturas: 53°C, 57°C, 59°C, 61°C y 63°C. El gel de agarosa mostró que a 63°C no se presentaba inespecificidad, por lo tanto se decidió trabajar con esta temperatura de alineamiento para este cebador (Figura 10).



Figura 9. Amplificación de *Colletotrichum* spp. usando CgInt+ITS 4.

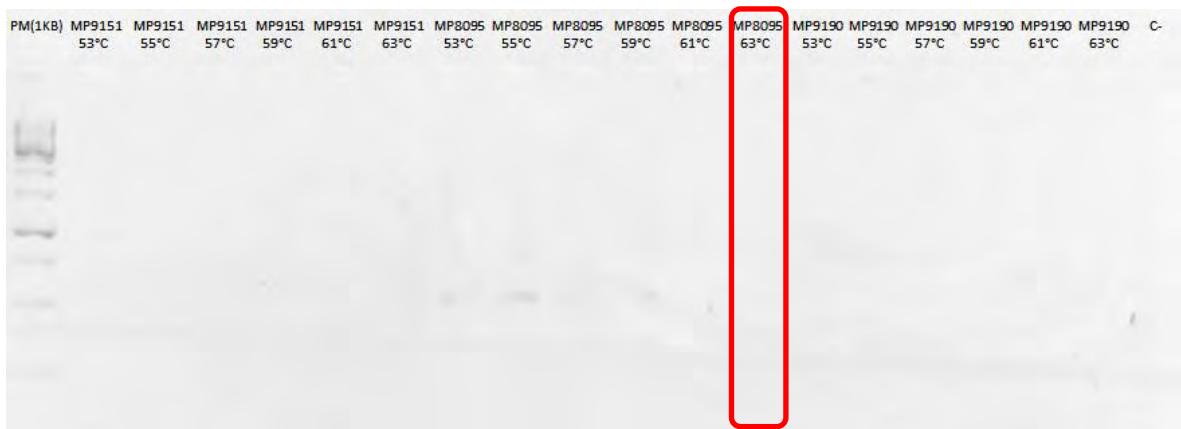


Figura 10. Amplificación de *Colletotrichum* spp. usando el cebador específico CgInt+ITS 4 con las siguientes temperaturas de alineamiento: 53°C, 57°C, 59°C, 61°C y 63°C.

La desnaturalización se realizó a 94°C durante 30 segundos para garantizar la apertura adecuada de la cadena molde. Es importante tener en cuenta que la temperatura de fusión o alineamiento (T_m) depende de factores como la longitud y secuencia de los iniciadores y es específica para cada primer, por lo tanto cada cebador exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de hibridación específica ya que si ésta es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa (Velasco, 2004), en este caso la temperatura optima de alineamiento para los cebadores universales y el específico para *Colletotrichum acutatum* fue de 55°C, mientras que para el cebador específico de *Colletotrichum gloeosporioides* fue de 63°C.

Además de las tres etapas de cada ciclo comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos. La previa, programada a 94°C, sirve básicamente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del ADN de partida, especialmente si este es de gran tamaño o posee regiones muy compactadas. La etapa final, por su parte, consiste en una prolongación de la última elongación, para permitir que se completen todos los fragmentos, que en este caso fue de 72°C. Se programaron 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y replicación para conseguir una amplificación de buena cantidad de moléculas con las secuencias de la región estudiada.

En cuanto a la mezcla patrón o stock, no se realizó ninguna modificación debido a que los componentes y su concentración final se encuentran dentro de los parámetros adecuados para obtener una amplificación positiva: el buffer (concentración final 1X) mantiene la mezcla patrón en el pH apropiado para que la reacción de la PCR tenga lugar, los desoxinucleótidos dNTPs (concentración final 0.2mM) proporcionan tanto la energía como los nucleótidos para la síntesis del ADN, los cebadores (concentración final 0.5µM) fragmentos cortos de ADN (20 – 30 bases) que se ligan al molde de ADN permitiéndole a la enzima Taq ADN polimerasa iniciar la incorporación de desoxinucleótidos, la Taq polimerasa (concentración final 0.0375U/µl) es una enzima estable al calor que agrega desoxinucleótidos y ADN molde (concentración final 2ng/µl) que será amplificado por la PCR (Velasco, 2004).

Los cebadores específicos para *Colletotrichum* han sido utilizados en varios estudios para la identificación de poblaciones de *Colletotrichum* que se han encontrado infectando varios hospederos (Freeman et al., 2000; Freeman et al., 2001; Talhinhos et al., 2002; Afanador et al., 2003; Marulanda et al., 2007; Jeleu et al., 2008; Martínez et al., 2009). En este estudio estos cebadores fueron confiables para identificar a *Colletotrichum acutatum* como el agente causal de antracnosis en tomate de árbol en los departamentos de Nariño y Putumayo. En total se obtuvieron bandas positivas para 101 aislamientos (33 provenientes de Nariño y 68 provenientes de Putumayo) con los cebadores específicos para *Colletotrichum acutatum* (Calnt2 + ITS4), y resultados negativos para dos aislamientos provenientes del departamento de Putumayo (MP9176 y MP9193) (Figura 11), mientras que con el cebador específico para *Colletotrichum gloeosporioides* (Cglnt + ITS4) con los 103 aislamientos se obtuvieron resultados negativos (Figura 12).

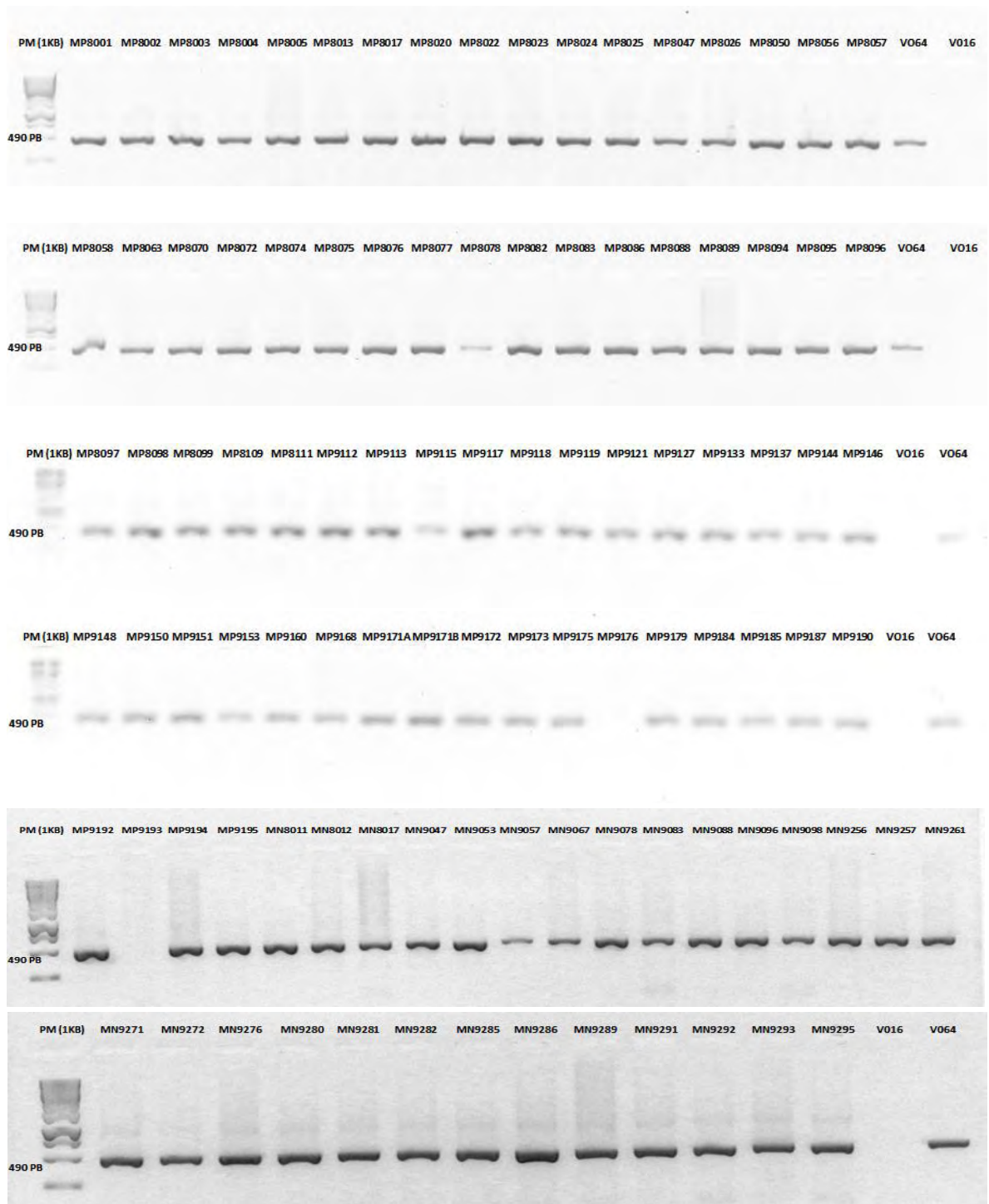


Figura 11. Gels para verificación de amplificación de ADN de los asilamientos de *Colletotrichum* spp. provenientes de los departamentos de Nariño y Putumayo. Cebadores específicos para *C. acutatum* (Calnt2 + ITS4).

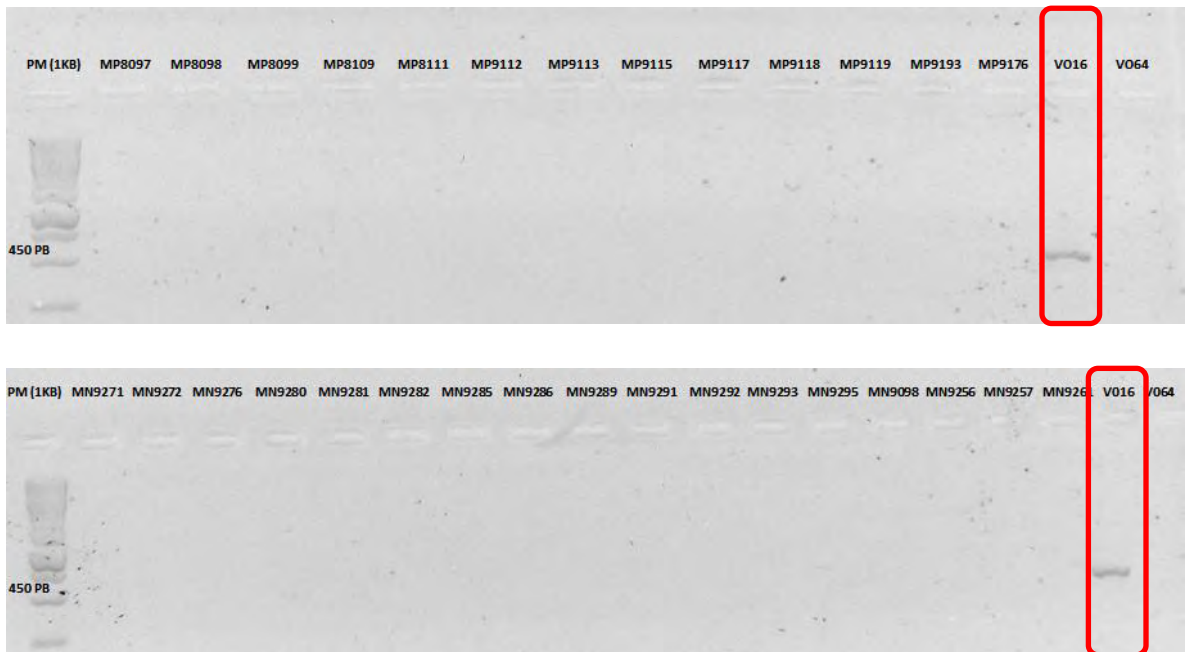


Figura 12. Geles para verificación de amplificación de ADN de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. provenientes de los departamentos de Nariño y Putumayo. Cebadores específicos para *C. gloeosporioides* (CgInt + ITS4).

Para la diferenciación de especies de *Colletotrichum*, Mills *et al.* en 1994 determinaron la secuencia de nucleótidos de la región ITS1 de varias especies del hongo. Basados en esta información, desarrollaron cebadores que se usaron con ITS4. Estos fueron útiles para diferenciación de *C. gloeosporioides* frente a *C. fragariae*, y *C. kahawae*, sin embargo no diferenció aislamientos de *C. acutatum* frente a *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* de fresa. Posteriormente, estudios llevados a cabo por Adaskaveg y Hartin en 1997 para diferenciar especies de *Colletotrichum* aisladas de varias frutas (almendro, fresa, durazno, manzana, cítricos y papaya de diferentes zonas de Estados Unidos) lograron sintetizar y probar los cebadores CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') para *C. gloeosporioides* y para *C. acutatum*, Calnt1 (5'-GGCGCCGGCCCCACCSCGGGG-3') y Calnt2(5'-GGCGCCGGCCCCGTCACGGGGG-3').

Los resultados de este trabajo concuerdan con lo encontrado por Saldarriaga en el 2008, Sanabria en el 2007 y Afanador *et al.*, 2003 quienes mediante la aplicación de PCR en el diagnóstico de patógenos vegetales reportan la presencia de *Colletotrichum acutatum* como agente causal de antracnosis en tomate de árbol en Colombia, pese a que tradicionalmente se ha identificado a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc como el agente causal de esta enfermedad (Botero, 1999; Botero, 2001; Rondon, 2003; Delgado y Vásquez, 2010). Además se verificaron los resultados de autores como Freeman, Katan y Shabi (1998) quienes reportan la capacidad de *C. acutatum* para causar enfermedad en un amplio rango de hospederos y en localizaciones geográficas diferentes,

por lo que es considerado como un patógeno cosmopolita (Talhinhas *et al.* 2002). La antracnosis producida por *C. acutatum* se ha encontrado afectando cultivos de papaya (*Carica papaya*) (Sutton, 1992), fresa (*Fragaria x ananassa*) (Leandro *et al.*, 2001; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Jeleu *et al.*, 2008), almendra (*Prunus dulcis*), y arandano (*Vaccinium virgatum*) (Wharton y Schilder, 2008) entre otras, atribuyéndosele la infección de más de 40 hospederos alrededor del mundo (Forster & Adaskaveg, 1999; Freeman *et al.*, 2000; Sreenivasaprasad & Talhinhas, 2005; Denoyes-Rothan *et al.*, 2005), razón por la cual, una de las principales preocupaciones es su capacidad para adaptarse a nuevos hospederos (Freeman *et al.*, 1998).

La caracterización de especies de *Colletotrichum* se ha basado en varios tipos de criterios, incluyendo morfológicos y características en cultivo tales como tamaño y forma de las conidias, color de la colonia, presencia o ausencia de setas, existencia del teleomorfo *G. cingulata* y sensibilidad al benomyl entre otros (Freeman *et al.*, 1998; Freeman y Katan, 1997; Abang *et al.*, 2004). Sin embargo, debido a las influencias medioambientales en la estabilidad de las características morfológicas y la existencia de formas intermedias, estos criterios no son siempre los adecuados para la diferenciación confiable de las especies de este género ya que una cepa puede ser identificada como una u otra especie dependiendo de los criterios individuales del identificador (Sutton, 1992; Freeman *et al.*, 1998).

Esto se corrobora al comparar los resultados de este trabajo con los obtenidos en la caracterización morfológica de éstos mismos aislamientos realizada por Estrada y Lagos en el 2011, en la cual se reporta la presencia de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* como agentes causales de la antracnosis de tomate de árbol de los departamentos de Nariño y Putumayo basándose en características macroscópicas como color de la colonia frontal, color de la colonia reverso, borde de la colonia, aspecto del micelio, presencia de sectores y color de la esporulación, sin embargo al analizar la morfología de las conidias, que fue similar entre municipios de cada departamento, se encontró que concuerda con la reportada para *Colletotrichum acutatum*.

Estos resultados permiten enfatizar en la importancia de la aplicación de los marcadores moleculares en la taxonomía de los hongos ya que aclara las relaciones entre los distintos taxones que se encuentran separados por los estudios morfológicos y permiten entender la identidad y complejidad genética de una población de patógenos que afectan un hospedero en particular y así mismo es esencial para formular estrategias efectivas de manejo de enfermedades.

5.1.4 Análisis de variabilidad genética mediante marcadores RAPD. Se probaron 18 combinaciones de cebadores, de las cuales se obtuvo la siguiente información en los diferentes patrones de bandas (Tabla 9):

Tabla 9. Número de loci generados con cada combinación de cebadores mediante RAPDs.

COMBINACIÓN	PAR DE CEBADORES	CANTIDAD DE LOCI OBSERVADOS		
		NARIÑO	PUTUMAYO	TOTAL AISLAMIENTOS
A	OPD 01 / OPBA 08*	8	6	23
B	OPD 02 / OPBA 08	1	6	6
C	OPD 03 / OPBA 08	1	0	3
D	OPD01 / OPD02*	13	24	51
E	OPD01 / OPD03*	12	19	32
F	OPD02 / OPD03	5	15	13
H	OPAN08 / OPAN19*	6	15	26
I	OPAN08 / OPAN20	NA	NA	--
J	OPAN 08 / OPD 01*	15	31	55
K	OPAN19 / OPAN20	NA	NA	--
M	OPAN19 / OPD02*	26	34	55
N	OPAN20 / OPAD02	NA	NA	--
R	OPD 01 / OPAN 19	0	16	6
S	OPBA08 / OPAN19	NA	NA	--
T	OPAN08 / OPBA08	NA	NA	--
W	OPAN 08 / OPD 02*	7	10	23
X	OPAN 08 / OPD 03*	8	22	26
Z	OPAN19 / OPD03*	37	41	58
TOTAL DE BANDAS		139	239	377

*Combinaciones de cebadores que fueron seleccionados por mayor polimorfismo para el análisis del presente estudio. NA: no amplifico.

En general, los patrones de bandas obtenidos de *C. acutatum* con las nueve combinaciones seleccionadas (A: OPD01 / OPD02, D: OPAN08 / OPD01, E: OPAN08 / OPD02, H: OPAN08 / OPAN19, J: OPAN08 / OPD01, M: OPAN19 / OPD02; W: OPAN08 / OPD02, X: OPAN08 / OPD03, Z: OPAN19 / OPD03) presentaron diferencias entre los aislamientos de estudio y los controles, amplificándose 132 fragmentos para los aislamientos de Nariño y 302 para los de Putumayo, en total se generaron 349 fragmentos diferentes para los aislamientos de estudio (Tabla 10).

Tabla 10. Número de loci totales generados con las nueve combinaciones de cebadores.

COMBINACIONES ANALIZADAS	PAR DE CEBADORES	CANTIDAD DE LOCI OBSERVADOS		
		NARIÑO	PUTUMAYO	TOTAL AISLAMIENTOS
A	OPD 01 / OPBA 08	8	6	23
D	OPD01 / OPD02	13	24	51
E	OPD01 / OPD03	12	19	32
H	OPAN08 / OPAN19	6	15	26
J	OPAN 08 / OPD 01	15	31	55
M	OPAN19 / OPD02	26	34	55
W	OPAN 08 / OPD 02	7	10	23
X	OPAN 08 / OPD 03	8	22	26
Z	OPAN19 / OPD03	37	41	58
TOTAL DE BANDAS		132	202	349

Los aislamientos MN8012 del municipio de Pasto (Nariño) y MP9179 de Sibundoy (Putumayo) no presentaron productos de amplificación con ninguna de las 18 combinaciones por lo que no se incluyen en el análisis. Algunos de los aislamientos no presentaron productos de amplificación en diferentes combinaciones, lo cual puede ser explicado porque los cebadores no encontraron ninguna región homóloga con el ADN genómico de *C. acutatum* o porque así haya existido alguna región homóloga, las condiciones de la reacción no fueron suficientes para amplificarlo por ser un fragmento demasiado grande. La falta de productos amplificados puede resultar de cualquier cambio en la secuencia o en el sitio de unión (mutación puntual), lo cual impide que el primer se una y ocurra la amplificación como resultado de mutaciones (Luna *et al.*, 2003).

Para el análisis sólo se consideraron aquellas bandas que fueron capaces de ser distinguibles como presentes o ausentes dadas las condiciones propias de cada gel, tomándose como idénticas las bandas del mismo tamaño molecular. La intensidad de las bandas no fue considerada un factor polimórfico como lo sugiere Luna y colaboradores (2003). Se determinó como banda polimórfica aquella presente en una frecuencia mayor al 1 % y menor al 100 %, y como banda no polimórfica la presente en todos los patrones génicos (frecuencia del 100 %) (Luna *et al.*, 2003).

El mayor número de fragmentos amplificados se obtuvo con la combinación Z (OPAN19 / OPD03) con 37 bandas para los aislamientos de Nariño y 41 para los de Putumayo, mientras que el menor número correspondió a la combinación A (OPD 01 / OPD 02) con 8 bandas para los aislamientos de Nariño y 6 bandas para los de Putumayo; en promedio para cada uno de los aislamientos se obtuvo 18 fragmentos por combinación de par de cebadores, el tamaño molecular de los fragmentos osciló entre 100 y 1500 pb, rango esperado debido a las condiciones de reacción de PCR que limitan el tamaño de los fragmentos amplificados entre estos valores (Williams *et al.*, 1990, Luna *et al.*, 2003).

Los ocho aislamientos de Nariño amplificados con la combinación A (OPD 01 / OPBA 08) produjeron ocho bandas (Figura 13) con un tamaño molecular aproximado de 120 a 1050 pb, dos de las cuales fueron polimórficas con una frecuencia del 25% (Tabla 11). En cuanto a los 15 aislamientos de Putumayo amplificados con esta combinación produjeron 6 bandas (Figura 13) con un tamaño molecular aproximado de 110 a 850 pb, de las cuales cuatro fueron polimórficas (66.67%) (Tabla 11). Al analizar los 73 aislamientos evaluados se encontró un polimorfismo del 41.67%.

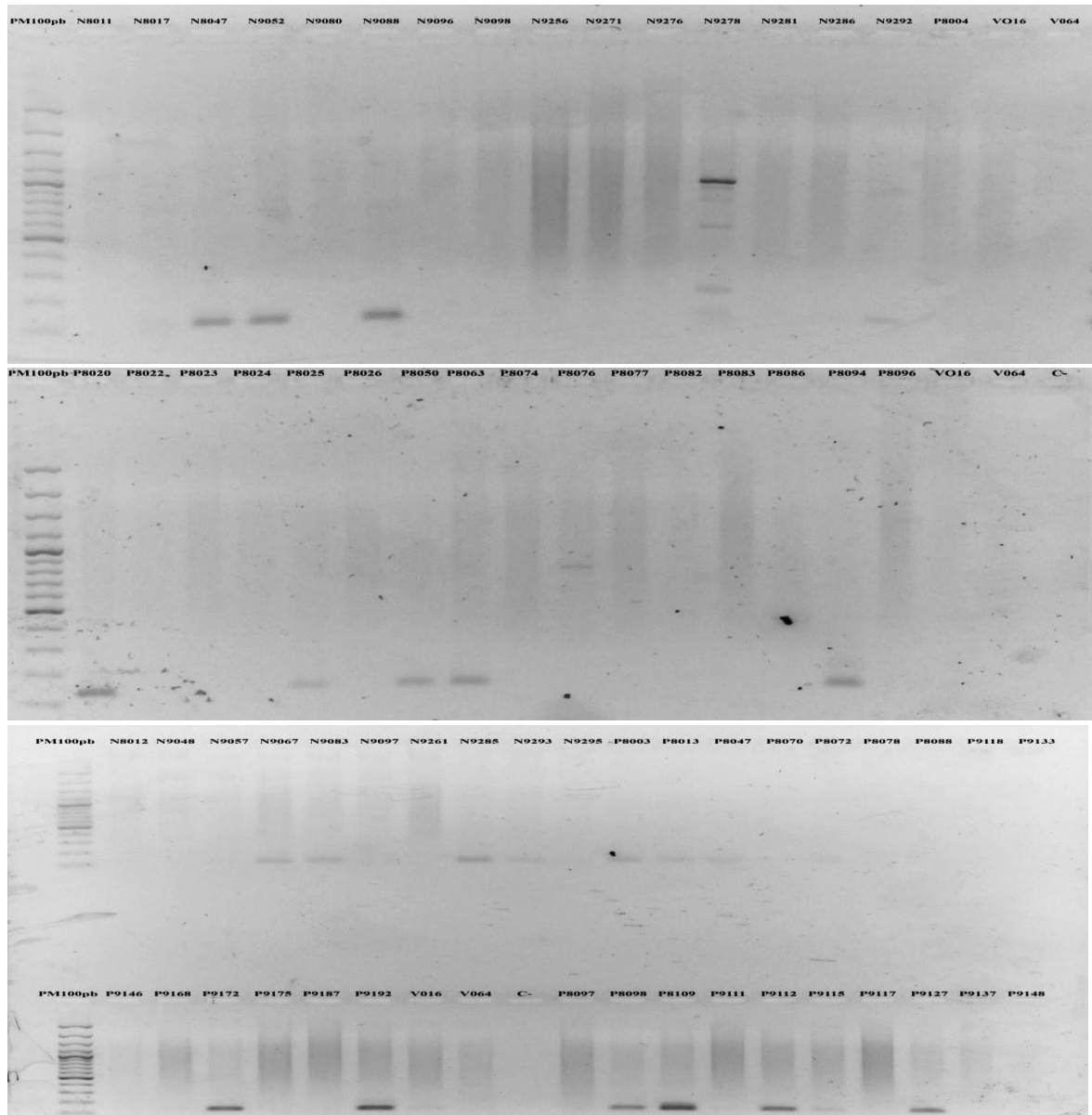


Figura 13. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación A: cebadores OPD 01 / OPBA 08; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para *C. acutatum*, V016: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción.

Tabla 11. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs con la combinación A (OPD 01 / OPBA 08).

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)			f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)			f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)			
			NARIÑO				PUTUMAYO				TOTAL			
1	1050	7.14	---	---	---	---	---	---	3.45	---	---	---		
2	950	7.14	---	---	---	---	---	---	3.45	---	---	---		
3	850	---	---	---	6.67	---	---	---	3.45	---	---	---		
4	800	7.14	---	---	---	---	---	---	3.45	---	---	---		
5	590	7.14	---	---	---	---	---	---	3.45	---	---	---		
6	250	7.14	---	---	---	---	---	---	3.45	---	---	---		
7	190	---	---	---	13.33	13.33	13.33	13.33	6.9	6.9	6.9	6.9		
8	170	---	---	---	13.33	13.33	13.33	13.33	6.9	6.9	6.9	6.9		
9	150	42.86	42.86	42.86	46.67	46.67	46.67	46.67	44.83	44.83	44.83	44.83		
10	140	7.14	---	---	13.33	13.33	13.33	13.33	10.34	10.34	10.34	10.34		
11	120	14.28	14.28	14.28	---	---	---	---	6.9	6.9	6.9	6.9		
12	110	---	---	---	6.67	6.67	6.67	6.67	3.45	3.45	3.45	3.45		
	TOTAL	100%	57.14%			86.66%			100%	75.87%				
			BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P
			8	2	25	6	4	66.67	12	5	41.67	12	5	41.67

f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$).

Los aislamientos de Nariño amplificados con la combinación D (OPD01 / OPD02) produjeron 13 bandas (Figura 14) con un tamaño molecular aproximado de 350 a 1150 pb, las cuales presentaron el 61.54% de polimorfismo (8 bandas polimórficas), evidenciando alta variabilidad dentro de la población. Con los aislamientos de Putumayo se obtuvo 24 bandas con un tamaño molecular aproximado de 150 a 1120 pb de las cuales el 62.5% fueron polimórficas (15 bandas). Al analizar los 73 aislamientos evaluados se observó un polimorfismo del 67.74% correspondiente a 21 bandas de las 31 bandas obtenidas (Tabla 12).

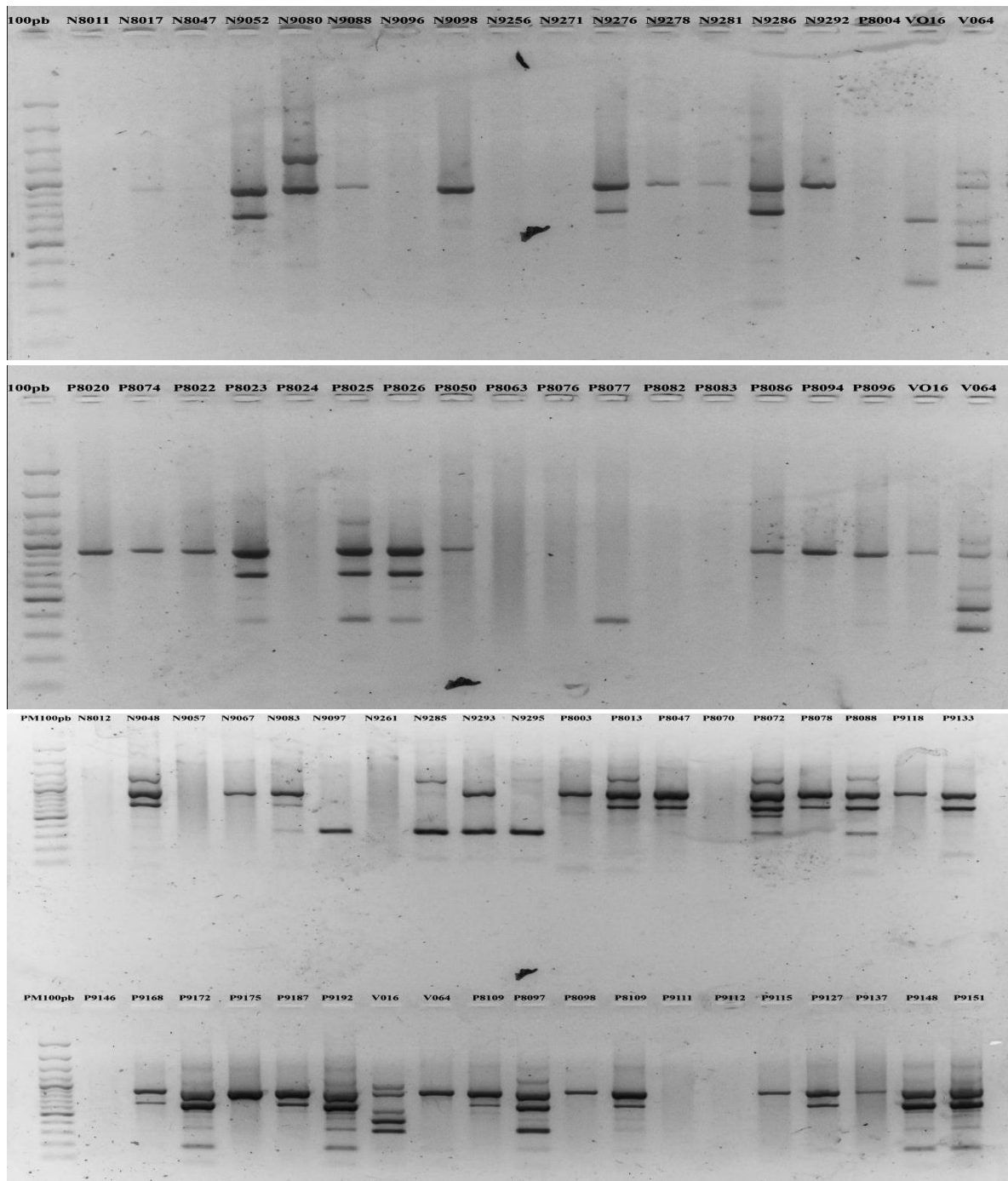


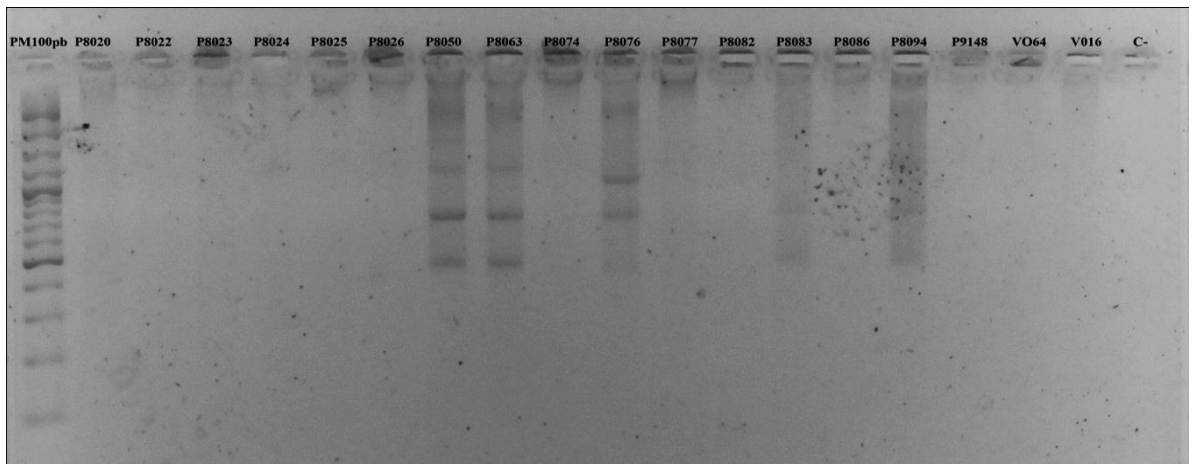
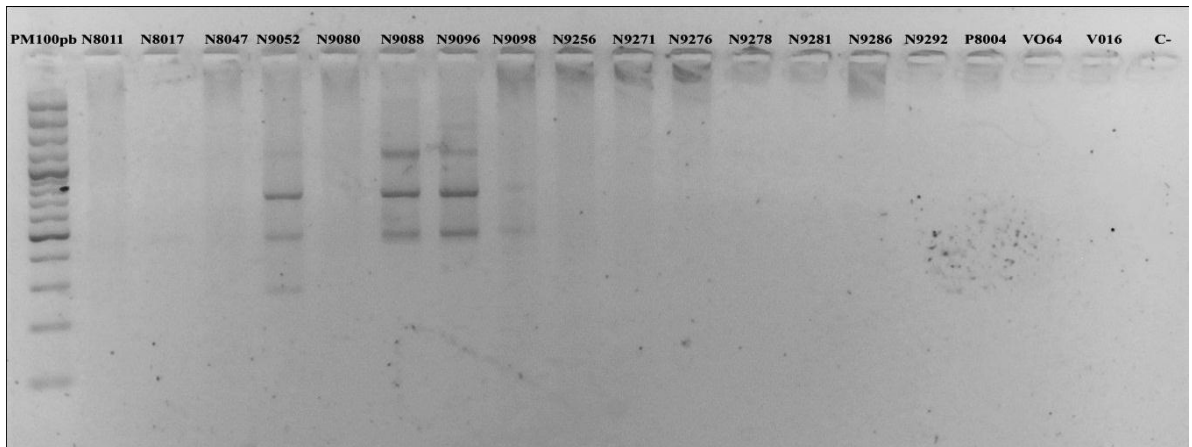
Figura 14. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación D: cebadores OPD01 / OPD02; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000pb) marca Fermentas. V064: Control positivo para *C. acutatum*; V016: Control alternativo (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción.

Tabla 12. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación D (OPD01 / OPD02).

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)			f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)			f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		
			NARIÑO				PUTUMAYO				TOTAL		
1	1150	7.69	7.69	---	---	---	---	1.89	---	---	1.89	---	---
2	1120	7.69	7.69	---	1.25	---	---	2.83	---	---	2.83	---	---
3	1100	---	---	---	1.25	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
4	1080	---	---	---	1.25	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
5	1050	---	---	---	1.25	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
6	1000	7.69	7.69	---	---	---	---	1.89	---	---	1.89	---	---
7	990	11.54	11.54	---	1.25	---	---	3.77	---	---	3.77	---	---
8	980	3.85	---	---	---	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
9	960	7.69	7.69	---	---	---	---	1.89	---	---	1.89	---	---
10	950	11.54	11.54	---	6.25	6.25	---	7.55	---	---	7.55	---	---
11	920	3.85	---	---	5.0	5.0	---	4.72	---	---	4.72	---	---
12	900	3.85	---	---	11.25	11.25	---	9.43	---	---	9.43	---	---
13	850	---	---	---	5.0	5.0	---	3.77	---	---	3.77	---	---
14	800	---	---	---	7.5	7.5	---	5.66	---	---	5.66	---	---
15	780	---	---	---	3.75	3.75	---	2.83	---	---	2.83	---	---
16	750	3.85	---	---	---	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
17	730	3.85	---	---	---	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
18	700	11.54	11.54	---	3.75	3.75	---	5.66	---	---	5.66	---	---
19	670	---	---	---	1.25	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
20	650	---	---	---	3.75	3.75	---	2.83	---	---	2.83	---	---
21	630	---	---	---	8.75	8.75	---	6.60	---	---	6.60	---	---
22	600	---	---	---	3.75	3.75	---	2.83	---	---	2.83	---	---
23	590	---	---	---	1.25	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
24	520	---	---	---	8.75	8.75	---	6.60	---	---	6.60	---	---
25	500	---	---	---	1.25	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
26	390	---	---	---	5.0	5.0	---	3.77	---	---	3.77	---	---
27	350	15.38	15.38	---	---	---	---	3.77	---	---	3.77	---	---
28	320	---	---	---	7.5	7.5	---	5.66	---	---	5.66	---	---
29	300	---	---	---	1.25	---	---	0.94	---	---	0.94	---	---
30	180	---	---	---	6.25	6.25	---	4.72	---	---	4.72	---	---
31	150	---	---	---	2.5	2.5	---	1.89	---	---	1.89	---	---
	TOTAL	100 %	80.76%			100	88.75 %			100 %	90.56%		
			BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P		
			13	8	61.54	24	15	62.5	31	21	67.74		

f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$).

Con la combinación E (OPD01 / OPD03) los aislamientos de Nariño produjeron 12 bandas en total (Figura 15) con un tamaño molecular aproximado de 80 a 1130 pb, con dos bandas de frecuencia \leq a 10% para un polimorfismo del 41.67% (Tabla 13). Para los aislamientos de Putumayo se produjeron 19 bandas con un tamaño molecular aproximado de 110 a 1250 pb, de las cuales 11 bandas representaron un polimorfismo del 57.89%. Con los 73 aislamientos se obtuvo 25 bandas de las cuales 14 fueron polimórficas, lo que corresponde al 56% de polimorfismo.



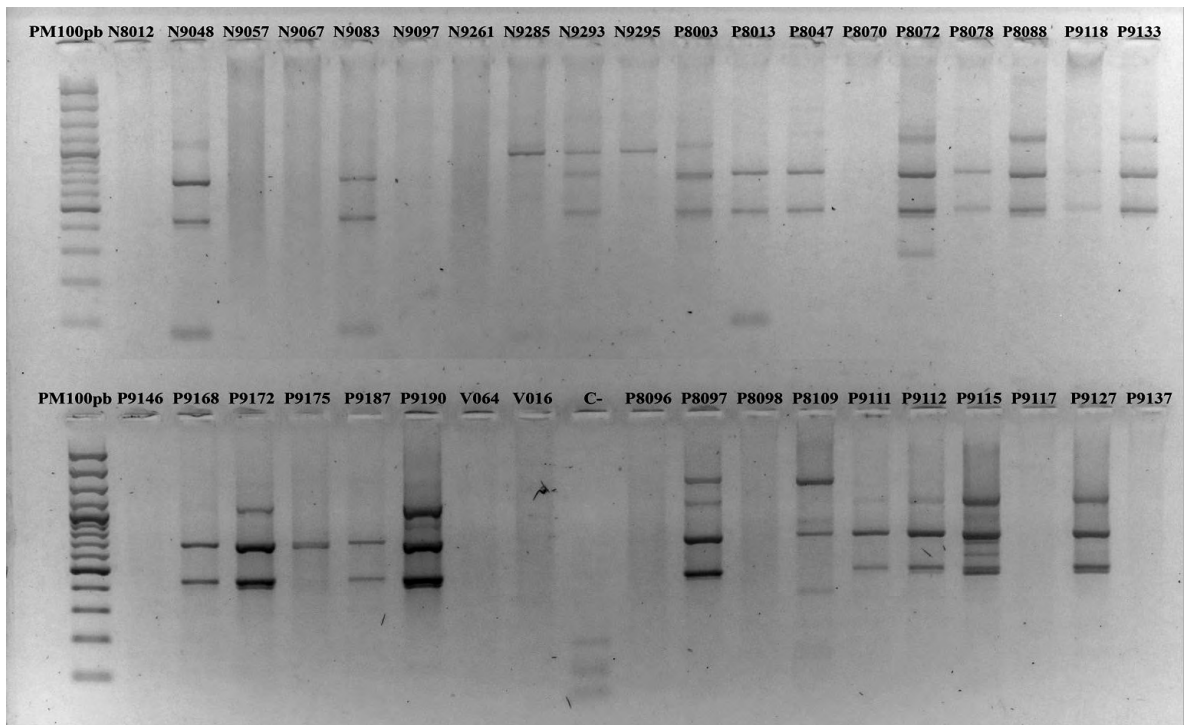


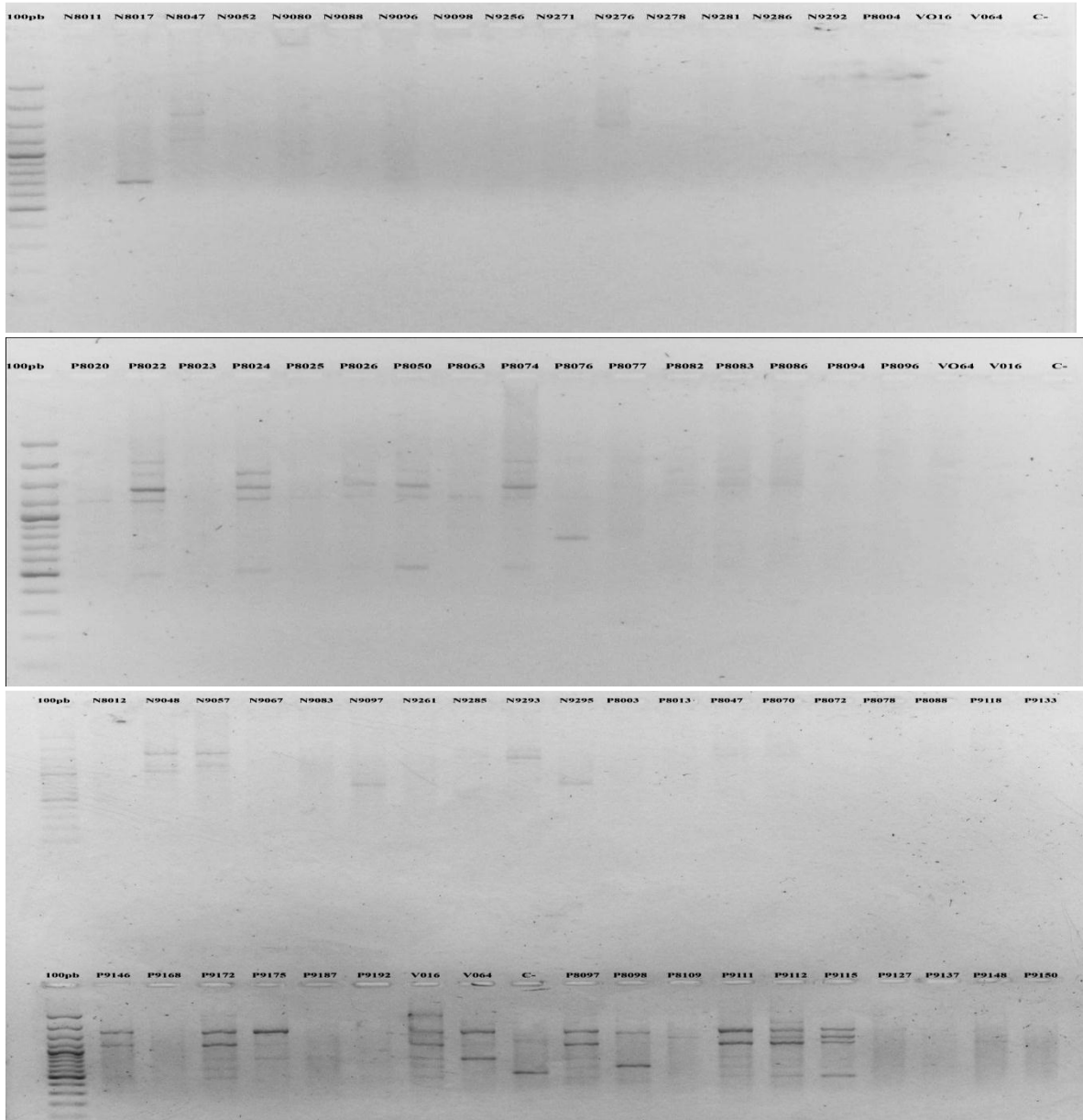
Figura 15. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación E: cebadores OPD01 / OPD03; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para *C. acutatum*; V016: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción.

Tabla 13. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación E (OPD01 / OPD03).

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)			f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)			f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		
			NARIÑO				PUTUMAYO				TOTAL		
1	1250	---	---	---	3.28	3.28	---	---	2.44	2.44	---	---	---
2	1130	9.52	9.52	---	3.28	3.28	---	---	4.88	4.88	---	---	---
3	1110	---	---	---	11.47	11.47	---	---	8.54	8.54	---	---	---
4	1090	4.76	---	---	1.64	---	---	---	2.44	2.44	---	---	---
5	1020	---	---	---	1.64	---	---	---	1.22	---	---	---	---
6	1000	14.28	14.28	---	---	---	---	---	3.66	3.66	---	---	---
7	900	---	---	---	1.64	---	---	---	1.22	---	---	---	---
8	800	14.28	14.28	---	18.03	18.03	---	---	17.07	17.07	---	---	---
9	780	---	---	---	6.56	6.56	---	---	4.88	4.88	---	---	---
10	750	4.76	---	---	---	---	---	---	1.22	---	---	---	---
11	710	4.76	---	---	---	---	---	---	1.22	---	---	---	---
12	700	---	---	---	6.56	6.56	---	---	4.88	4.88	---	---	---
13	690	4.76	---	---	---	---	---	---	1.22	---	---	---	---
14	670	---	---	---	1.64	---	---	---	1.22	---	---	---	---
15	610	---	---	---	1.64	---	---	---	1.22	---	---	---	---
16	510	---	---	---	6.56	6.56	---	---	4.88	4.88	---	---	---
17	500	19.05	19.05	---	21.31	21.31	---	---	20.73	20.73	---	---	---
18	480	---	---	---	1.64	---	---	---	1.22	---	---	---	---
19	450	4.76	---	---	3.28	3.28	---	---	3.66	3.66	---	---	---
20	430	4.76	---	---	3.28	3.28	---	---	3.66	3.66	---	---	---
21	400	---	---	---	3.28	3.28	---	---	2.44	2.44	---	---	---
22	390	---	---	---	1.64	---	---	---	1.22	---	---	---	---
23	300	4.76	---	---	---	---	---	---	1.22	---	---	---	---
24	110	---	---	---	1.64	---	---	---	1.22	---	---	---	---
25	80	9.52	9.52	---	---	---	---	---	2.44	2.44	---	---	---
	TOTAL	100	66.65%			100	%			100	%		
		BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P
		12	5	41.67	19	11	57.89	25	14	56			

f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$).

La combinación H (OPAN08 / OPAN19) produjo seis bandas (Figura 16) para los aislamientos de Nariño con un tamaño molecular aproximado de 700 a 1280 pb, todas con una frecuencia \geq al 10%, y con un polimorfismo del 50% (Tabla 14). Para los aislamientos de Putumayo se produjeron 15 bandas de un tamaño molecular aproximado de 500 a 1350 pb, con un total de diez bandas con frecuencia menor al 10% y polimorfismo del 53.33% con esta combinación. Para los 73 aislamientos se amplificaron 16 bandas con un polimorfismo del 62.5%.



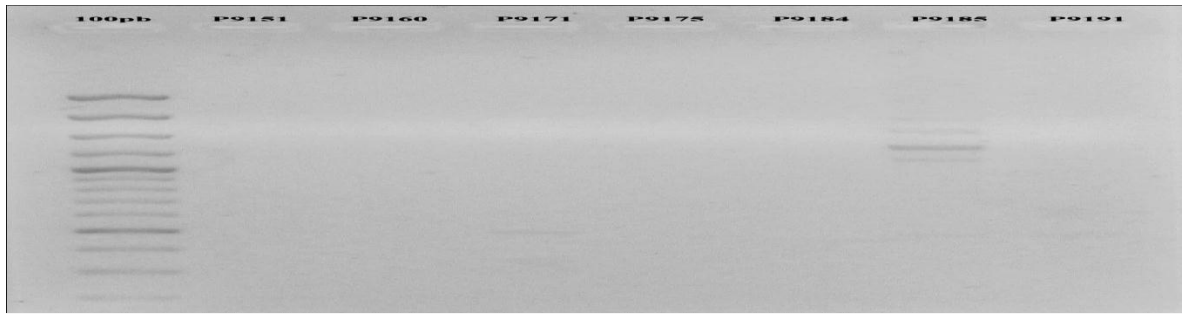


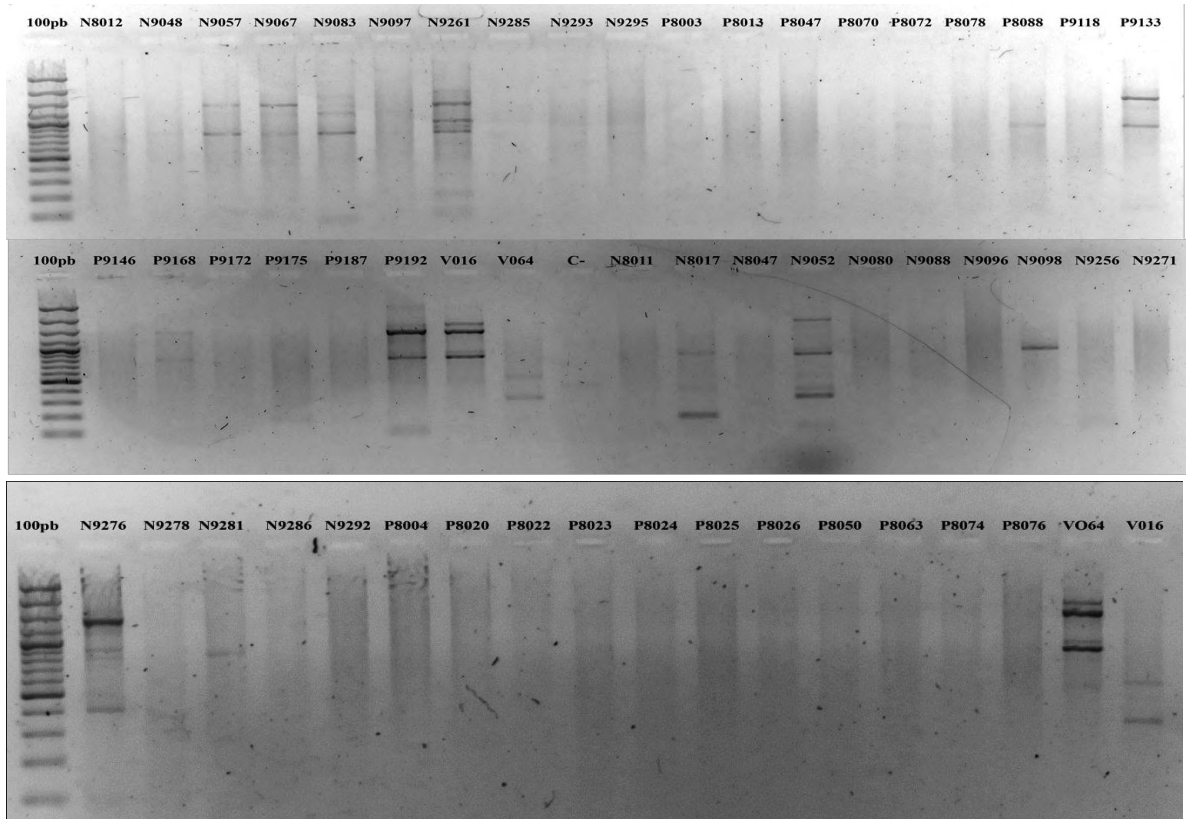
Figura 16. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación H: cebadores OPAN08 / OPAN19; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para *C. acutatum*; V016: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción.

Tabla 14. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación H OPAN08 / OPAN19).

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	NARIÑO			PUTUMAYO			TOTAL		
		f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)			
1	1350	---	---	2.22	---	1.82	---	---	---	
2	1320	---	---	4.44	4.44	3.64	3.64	3.64	3.64	
3	1300	---	---	2.22	---	1.82	---	---	---	
4	1280	30.0	30.0	11.11	11.11	14.54	14.54	14.54	14.54	
5	1250	---	---	11.11	11.11	9.09	9.09	9.09	9.09	
6	1200	10.0	---	17.78	17.78	16.36	16.36	16.36	16.36	
7	1190	---	---	2.22	---	1.82	---	---	---	
8	1120	---	---	15.55	15.55	12.73	12.73	12.73	12.73	
9	1110	20.0	20.0	11.11	11.11	12.73	12.73	12.73	12.73	
10	1080	---	---	2.22	---	1.82	---	---	---	
11	1050	10.0	---	---	---	1.82	---	---	---	
12	820	---	---	6.67	6.67	5.45	5.45	5.45	5.45	
13	800	20.0	20.0	2.22	---	5.45	5.45	5.45	5.45	
14	700	10.0	---	2.22	---	3.64	3.64	3.64	3.64	
15	550	---	---	2.22	---	1.82	---	---	---	
16	500	---	---	6.67	6.67	5.45	5.45	5.45	5.45	
TOTAL		100 %	70 %	100 %	100 %	100 %	100 %	89.08%	89.08%	
		BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P
		6	3	50	15	8	53.33	16	10	62.5

f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$).

La combinación J (OPAN 08 / OPD 01) generó para los aislamientos de Nariño 16 bandas (Figura 17) con un tamaño molecular de 100 a 1320 pb de las cuales 13 bandas presentaron una frecuencia $\leq 10\%$ con esta combinación, para un polimorfismo del 31.25%. Con los aislamientos de Putumayo se obtuvo 31 bandas con un tamaño aproximado de 110 a 1410 pb, de las cuales 21 aportaron un polimorfismo del 67.74%. Para los 73 aislamientos analizados en general se obtuvo un polimorfismo del 73.68% representado en 28 bandas de las 38 obtenidas (Tabla 15).



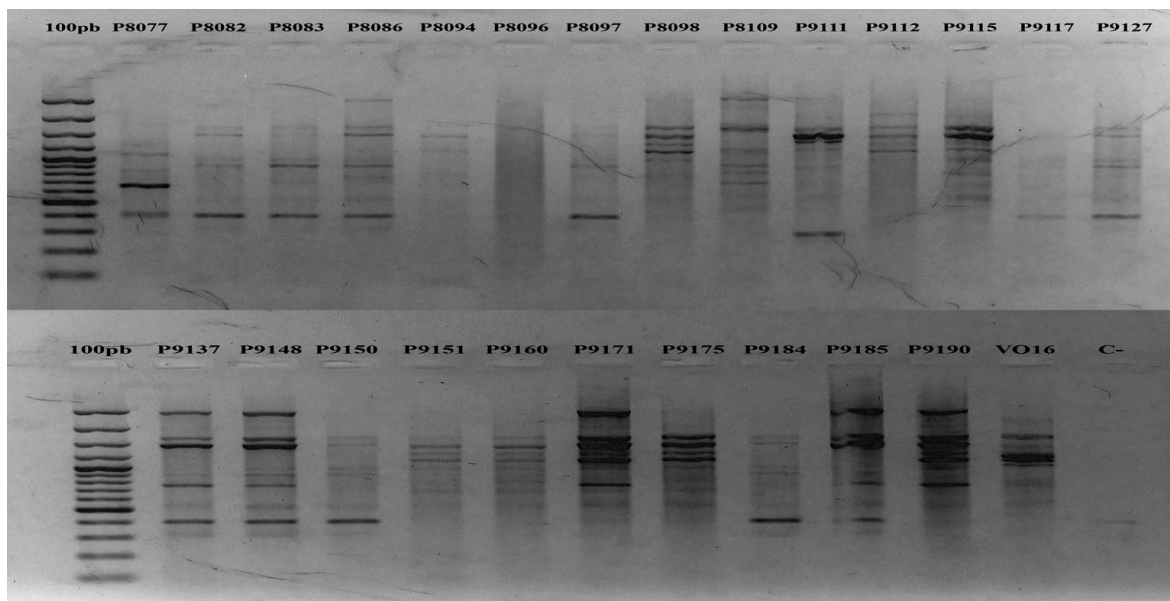


Figura 17. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación J (OPAN 08 / OPD 01); PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para *C. acutatum*; V016: Control alternativo (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción.

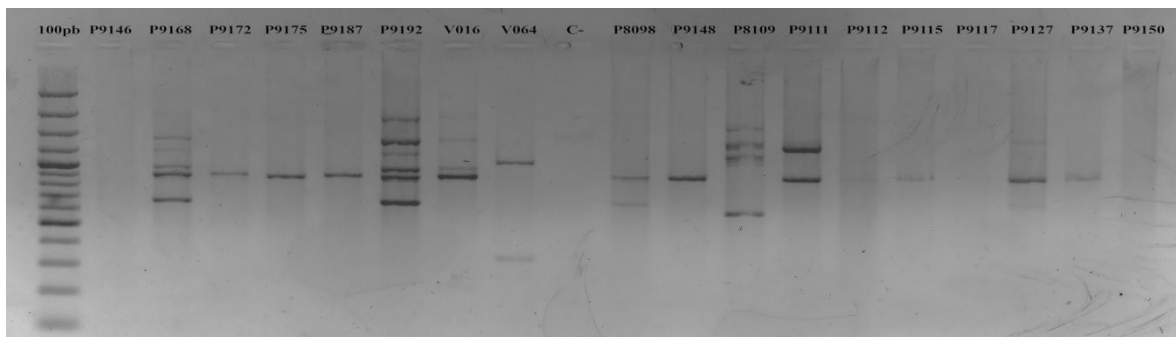
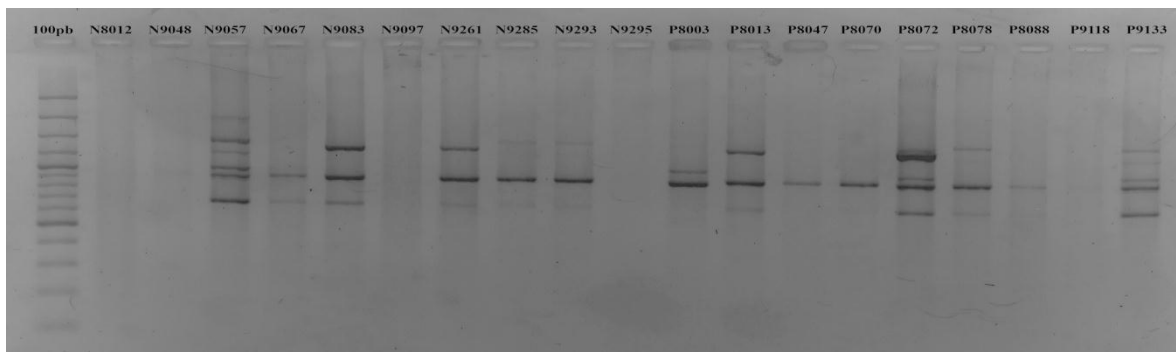
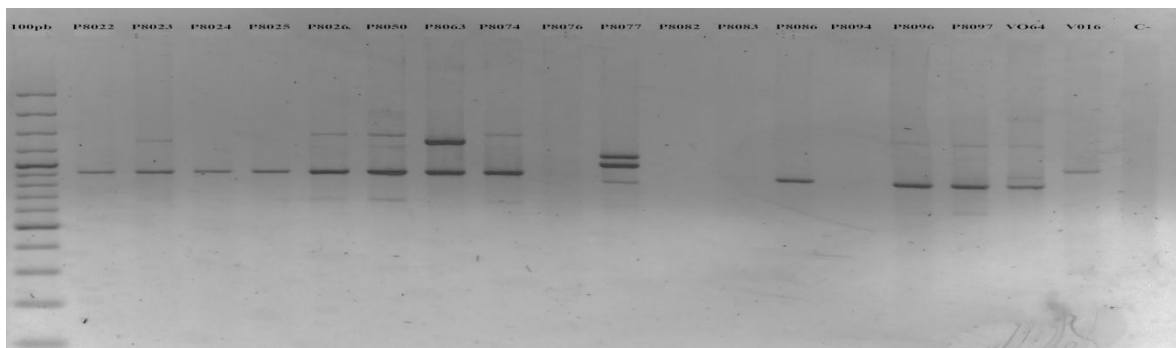
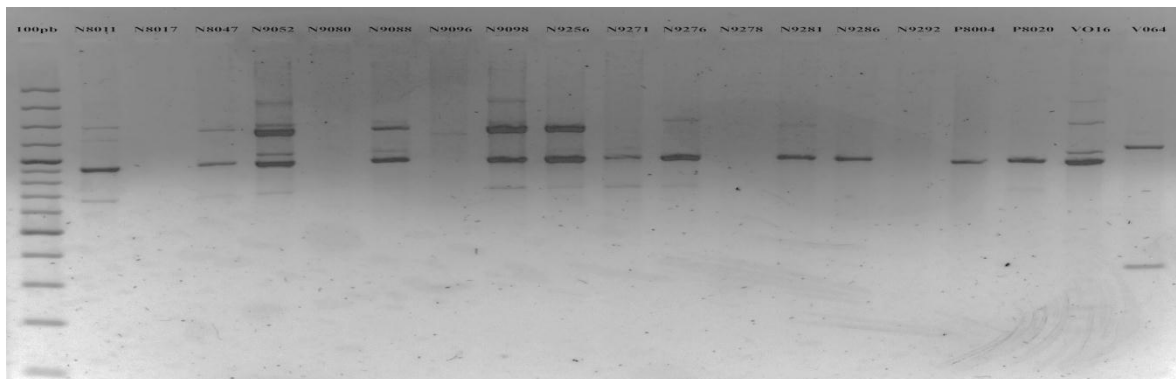
Tabla 15. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación J (OPAN 08 / OPD 01).

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUENCIA		f (%)	FRECUENCIA	
			FRAGMENTOS			FRAGMENTOS	
			POLIMÓRFICOS			POLIMÓRFICOS	
			(%)	(%)		(%)	(%)
			NARIÑO	PUTUMAYO		TOTAL	
1	1410	---	---	3.36	3.36	2.82	2.82
2	1400	---	---	1.68	1.68	1.41	1.41
3	1390	---	---	1.68	1.68	1.41	1.41
4	1320	4.35	---	0.84	---	1.41	1.41
5	1260	---	---	1.68	1.68	1.41	1.41
6	1250	---	---	6.72	6.72	3.52	3.52
7	1230	---	---	4.20	4.20	3.52	3.52
8	1210	13.04	13.04	5.88	5.88	7.04	7.04
9	1200	---	---	5.04	5.04	4.22	4.22
10	1190	4.35	---	5.04	5.04	4.93	4.93
11	1140	---	---	1.68	1.68	1.41	1.41
12	1120	---	---	5.04	5.04	4.22	4.22
13	1110	8.69	8.69	---	---	1.41	1.41
14	1090	---	---	7.56	7.56	6.34	6.34
15	1070	---	---	0.84	---	0.70	---
16	1050	4.35	---	0.84	---	1.41	1.41

17	1000	8.69	8.69	9.24	9.24	9.15	9.15			
18	990	4.35	---	---	---	0.70	---			
19	910	---	---	3.36	3.36	2.82	2.82			
20	900	4.35	---	4.20	4.20	4.22	4.22			
21	850	17.39	17.39	---	---	2.82	2.82			
22	810	---	---	0.84	---	0.70	---			
23	800	---	---	0.84	---	0.70	---			
24	790	---	---	3.36	3.36	2.82	2.82			
25	750	---	---	0.84	---	0.70	---			
26	700	---	---	0.84	---	0.70	---			
27	650	---	---	1.68	1.68	2.82	2.82			
28	520	---	---	0.84	---	0.70	---			
29	510	---	---	5.88	5.88	4.93	4.93			
30	450	4.35	---	---	---	0.70	---			
31	410	4.35	---	---	---	0.70	---			
32	400	---	---	7.56	7.56	6.34	6.34			
33	390	---	---	2.52	2.52	2.11	2.11			
34	380	4.35	---	0.84	---	1.41	1.41			
35	310	---	---	4.20	4.20	3.52	3.52			
36	220	8.69	8.69	---	---	1.41	1.41			
37	110	4.35	---	0.84	---	1.41	1.41			
38	100	4.35	---	---	---	0.70	---			
	TOTAL	100	56.5%	100	91.56 %	100	92.26%			
		%		%		%				
		BT	BP	% P	BT	BP	% P			
		16	5	31.25	31	21	67.74	38	28	73.68

f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$).

Con la combinación M (OPAN19 / OPD02), para los aislamientos de Nariño, se generaron 26 bandas (Figura 18) con un tamaño molecular aproximado de 610 a 1340 pb, 11 de las cuales fueron polimórficas (42.31% de polimorfismo). Esta combinación produjo 34 bandas (Tabla 16) para Putumayo con un tamaño molecular aproximado de 550 a 1320 pb todas con frecuencias menores al 10%, se obtuvo un porcentaje de polimorfismo del 67.65%. Al analizar los 73 aislamientos se observó un porcentaje de polimorfismo de 68.29% representado por 28 bandas de las 41 obtenidas con esta combinación.



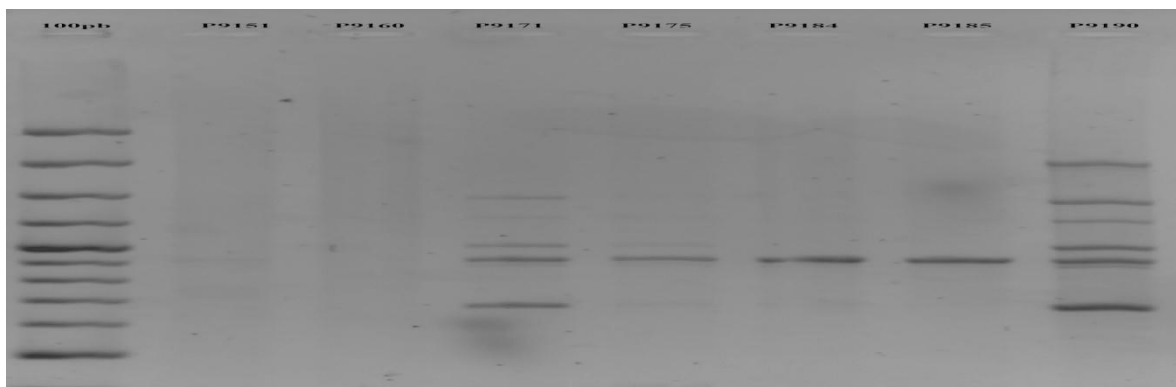


Figura 18. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs utilizando la combinación M: OPAN19 / OPD02; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. V064: Control positivo para *C. acutatum*; V016: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción.

Tabla 16. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación M (OPAN19 / OPD02).

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUCENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		f (%)	FRECUCENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	
			NARIÑO			PUTUMAYO	
			TOTAL			TOTAL	
1	1340	2.0	---	---	---	0.68	---
2	1320	2.0	---	1.04	---	1.37	1.37
3	1300	2.0	---	2.08	2.08	2.05	2.05
4	1290	---	---	2.08	2.08	1.37	1.37
5	1240	2.0	---	---	---	0.68	---
6	1230	2.0	---	---	---	0.68	---
7	1220	---	---	1.04	---	0.68	---
8	1210	2.0	---	---	---	0.68	---
9	1200	2.0	---	---	---	0.68	---
10	1190	2.0	---	3.12	3.12	2.74	2.74
11	1180	12.0	12.0	2.08	2.08	5.48	5.48
12	1170	2.0	---	1.04	---	1.37	1.37
13	1150	---	---	4.17	4.17	2.74	2.74
14	1120	6.0	6.0	6.25	6.25	6.16	6.16
15	1100	2.0	---	5.21	5.21	4.11	4.11
16	1090	---	---	1.04	---	0.68	---
17	1070	2.0	---	2.08	2.08	2.05	2.05
18	1040	2.0	---	---	---	0.68	---
19	1020	6.0	6.0	1.04	---	2.74	2.74
20	1010	8.0	8.0	3.12	3.12	4.79	4.79

21	1000	---	---	4.17	4.17	2.74	2.74
22	990	6.0	6.0	1.04	---	2.74	2.74
23	950	---	---	1.04	---	0.68	---
24	920	---	---	5.21	5.21	3.42	3.42
25	910	2.0	---	8.33	8.33	6.16	6.16
26	900	4.0	4.0	4.17	4.17	4.11	4.11
27	880	2.0	---	3.12	3.12	2.74	2.74
28	850	6.0	6.0	8.33	8.33	7.54	7.54
29	820	---	---	2.08	2.08	1.37	1.37
30	800	---	---	4.17	4.17	2.74	2.74
31	790	---	---	2.08	2.08	1.37	1.37
32	780	8.0	8.0	5.21	5.21	6.16	6.16
33	710	2.0	---	---	---	0.68	---
34	690	---	---	3.12	3.12	2.05	2.05
35	680	2.0	---	1.04	---	1.37	1.37
36	650	6.0	6.0	3.12	3.12	4.11	4.11
37	610	6.0	6.0	2.08	2.08	3.42	3.42
38	600	---	---	1.04	---	0.68	---
39	580	---	---	1.04	---	0.68	---
40	560	---	---	3.12	3.12	2.05	2.05
41	550	---	---	1.04	---	0.68	---
	TOTAL	100	68 %	100	88.5%	100	91.06%
		%		%		%	
		BT	BP	% P	BT	BP	% P
		26	11	42.31	34	23	67.65
		41	28	68.29			

f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$).

Los nueve aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño amplificados con la combinación W (OPAN 08 / OPD 02) produjeron ocho bandas (Figura 19) con un tamaño molecular aproximado de 750 a 1190 pb, tres de las cuales fueron polimórficas con una frecuencia \geq al 10% (polimorfismo 37.5%) para los aislamientos de Nariño. Los 13 aislamientos de Putumayo amplificados con la combinación W produjeron diez bandas (Figura 8) con un tamaño molecular aproximado de 600 a 1120 pb, cinco de estas con frecuencia menor al 10% mostrando un polimorfismo del 50% (Tabla 17). Los 73 aislamientos analizados presentaron un polimorfismo del 61.54% entre los diferentes aislamientos de *Colletotrichum acutatum*.

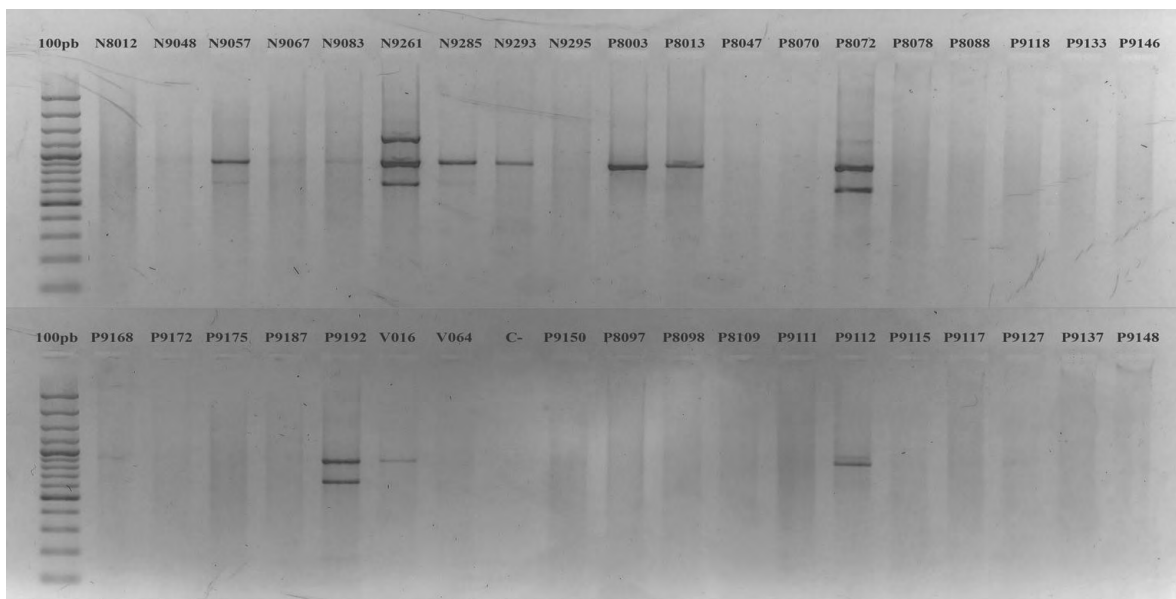
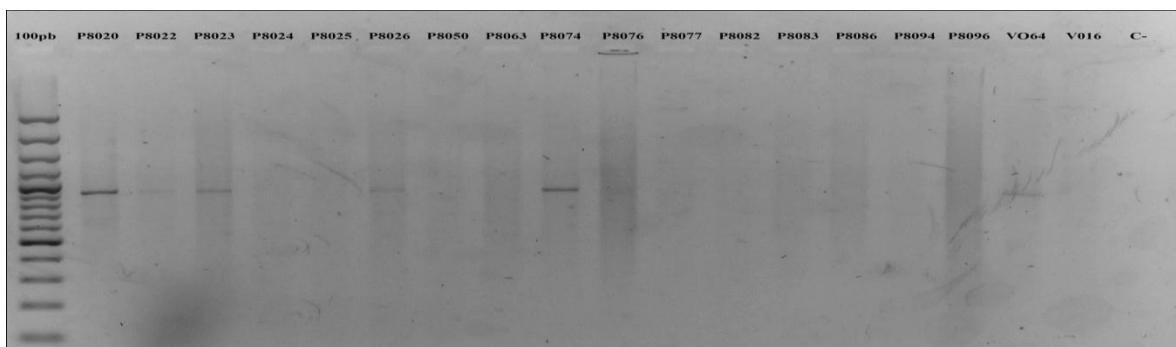
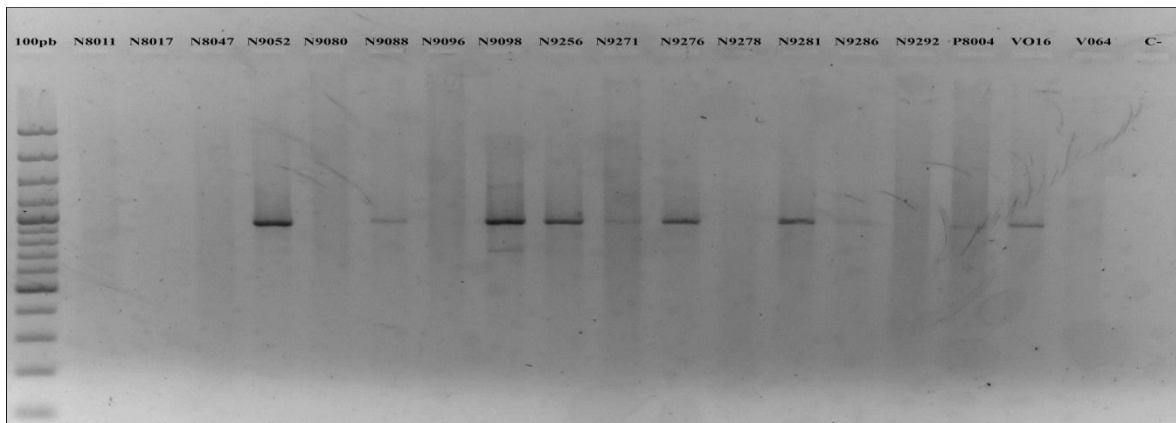




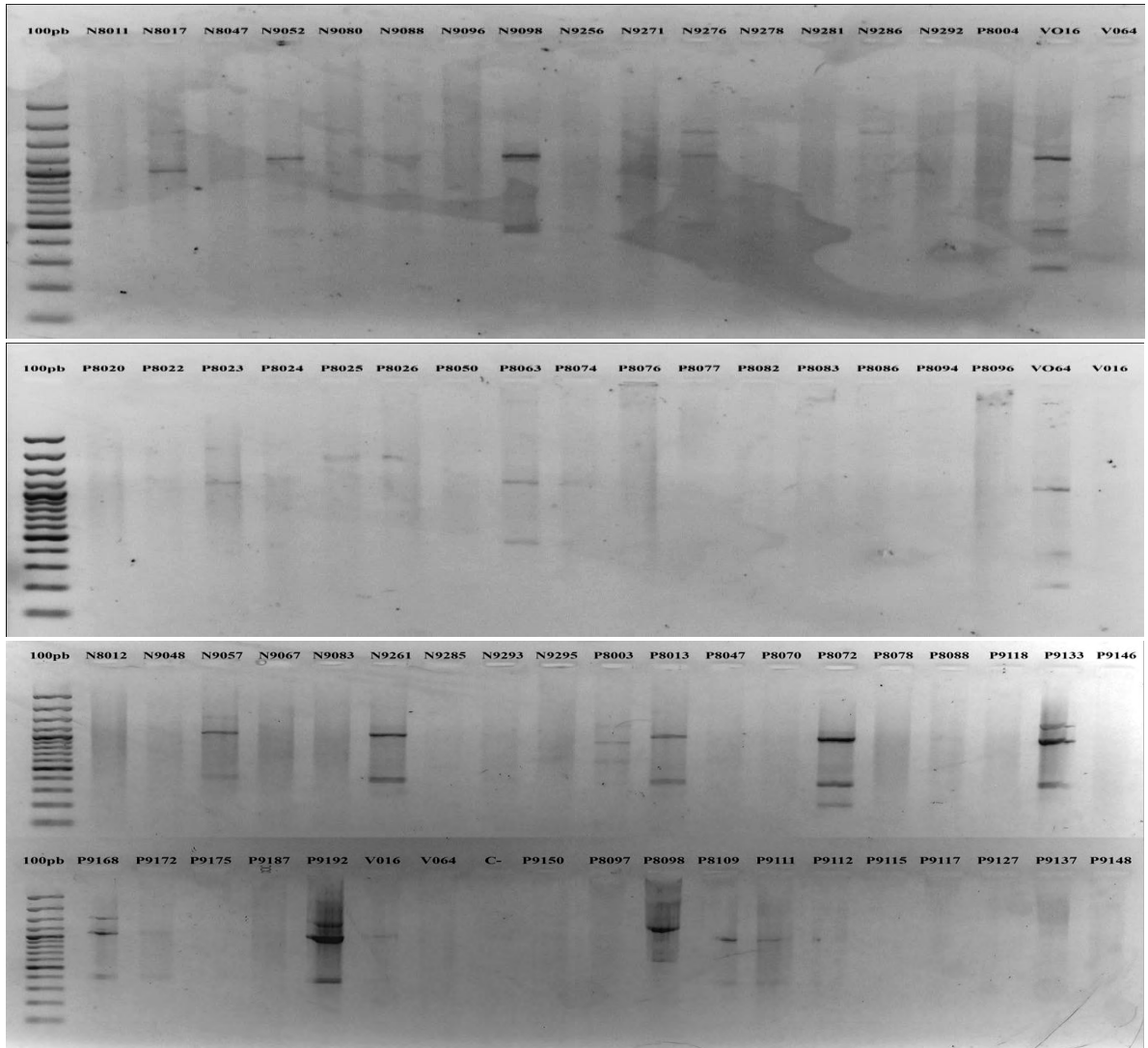
Figura 19. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación W: cebadores OPAN 08 / OPD 02; PM: ADN Ladder de 100 pb (100-3000bp). V064: Control positivo para *C. acutatum*; V016: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción.

Tabla 17. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs con la combinación W (OPAN 08 / OPD 02).

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)				
			NARIÑO		PUTUMAYO			TOTAL			
1	1190	6.67	---	---	---	---	3.03	---			
2	1120	6.67	---	---	5.55	---	6.06	6.06			
3	1000	33.33	33.33	16.67	16.67	16.67	24.24	24.24			
4	990	---	---	11.11	11.11	11.11	6.06	6.06			
5	950	6.67	---	---	5.55	---	6.06	6.06			
6	900	20.0	20.0	11.11	11.11	11.11	15.15	15.15			
7	890	---	---	---	5.55	---	3.03	---			
8	850	---	---	---	22.22	22.22	12.12	12.12			
9	780	20.0	20.0	---	---	---	9.09	9.09			
10	750	6.67	---	---	---	---	3.03	---			
11	680	---	---	11.11	11.11	11.11	6.06	6.06			
12	620	---	---	---	5.55	---	3.03	---			
13	600	---	---	---	5.55	---	3.03	---			
TOTAL		100 %	73.33 %	100 %	72.22 %	100 %	100 %	84.84 %			
			BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P
			8	3	37.5	10	5	50	13	8	61.54

f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$).

Con la combinación X (OPAN 08 / OPD 03) los aislamientos de Nariño produjeron ocho bandas (Figura 20) con un tamaño molecular aproximado de 390 a 1290 pb, con un total de cinco bandas con frecuencia \leq a 10%, que corresponde 37.5% de polimorfismo. Con los aislamientos de Putumayo se produjeron 22 bandas (Tabla 18) con un tamaño molecular aproximado de 200 a 1300 pb, con un polimorfismo de 54.54%. Al analizar los 73 aislamientos se obtuvo 24 bandas de las cuales 16 fueron polimórficas representando el 66.67% de polimorfismo.



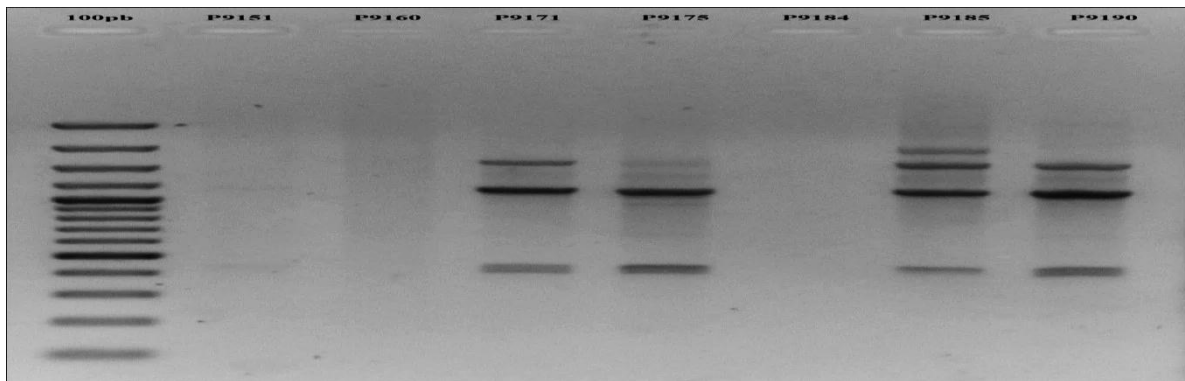


Figura 20. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación X: cebadores OPAN 08 / OPD 03; PM: ADN Ladder de 100 bp (100-3000bp). V064: Control positivo para *C. acutatum*; V016: Control alternativo (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción.

Tabla 18. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación X (OPAN 08 / OPD 03).

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUCENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		f (%)	FRECUCENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	
			NARIÑO	PUTUMAYO		TOTAL	
1	1300	---	---	2.38	---	1.89	---
2	1290	18.18	18.18	2.38	---	5.66	5.66
3	1220	---	---	4.76	4.76	3.77	3.77
4	1200	---	---	7.14	7.14	5.66	5.66
5	1150	---	---	9.52	9.52	7.55	7.55
6	1130	18.18	18.18	---	---	3.77	3.77
7	1120	---	---	2.38	---	1.89	---
8	1110	9.09	---	7.14	7.14	7.55	7.55
9	1100	9.09	---	2.38	---	3.77	3.77
10	1080	---	---	2.38	---	1.89	---
11	1050	9.09	---	7.14	7.14	7.55	7.55
12	1010	18.18	18.18	2.38	---	5.66	5.66
13	1000	---	---	2.38	---	1.89	---
14	990	---	---	4.76	4.76	3.77	3.77
15	900	---	---	7.14	7.14	5.66	5.66
16	600	---	---	2.38	---	1.89	---
17	580	---	---	2.38	---	1.89	---
18	420	---	---	4.76	4.76	3.77	3.77
19	410	9.09	---	9.52	9.52	9.43	9.43
20	400	---	---	4.76	4.76	3.77	3.77
21	390	9.09	---	---	---	1.89	---
22	380	---	---	4.76	4.76	3.77	3.77
23	350	---	---	4.76	4.76	3.77	3.77

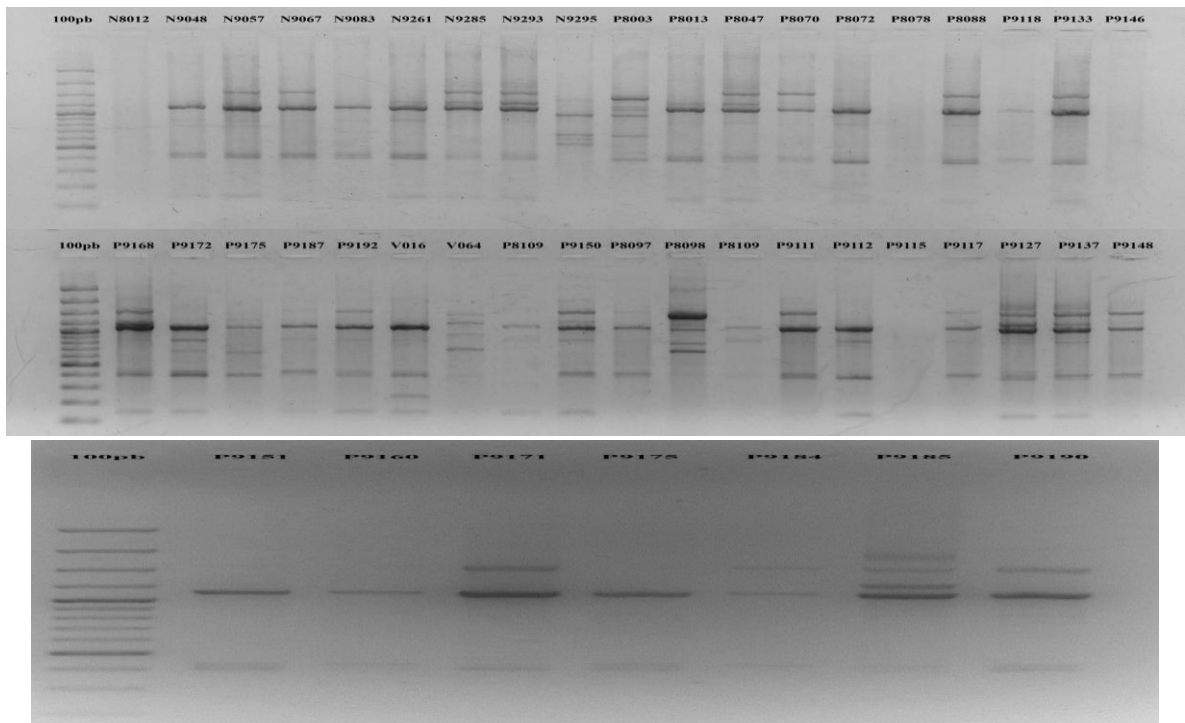


Figura 21. Patrón de bandas obtenidas para los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación Z: cebadores OPAN19 / OPD03; PM: ADN Ladder de 100 bp (100-3000bp V064: Control positivo para *C. acutatum*; V016: Control alternativo (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción.

Tabla 19. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 75 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación Z (OPAN19 / OPD03).

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS		f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS	
			NARIÑO (%)	PUTUMAYO (%)		TOTAL (%)	TOTAL (%)
1	1400	---	---	0.57	---	0.35	---
2	1340	0.92	---	---	---	0.35	---
3	1300	1.85	1.85	2.27	2.27	2.11	2.11
4	1290	0.92	---	---	---	0.35	---
5	1280	3.70	3.70	2.27	2.27	2.82	2.82
6	1250	0.92	---	---	---	0.35	---
7	1230	0.92	---	2.84	2.84	2.11	2.11
8	1220	5.55	5.55	3.98	3.98	4.58	4.58
9	1210	1.85	1.85	1.70	1.70	1.76	1.76
10	1200	---	---	5.68	5.68	3.52	3.52
11	1190	---	---	2.27	2.27	1.41	1.41
12	1170	0.92	---	0.57	---	0.70	0.70

13	1160	---	---	1.70	1.70	1.06	1.06
14	1150	0.92	---	0.57	---	0.70	0.70
15	1130	3.70	3.70	1.70	1.70	2.46	2.46
16	1120	0.92	---	---	---	0.35	---
17	1110	1.85	1.85	1.14	1.14	1.41	1.41
18	1100	---	---	2.27	2.27	1.41	1.41
19	1090	2.78	2.78	5.68	5.68	4.58	4.58
20	1080	2.78	2.78	2.84	2.84	2.82	2.82
21	1070	9.26	9.26	3.41	3.41	5.63	5.63
22	1050	0.92	---	4.54	4.54	3.17	3.17
23	1020	---	---	4.54	4.54	2.82	2.82
24	1010	0.92	---	2.84	2.84	2.11	2.11
25	1000	1.85	1.85	2.84	2.84	2.46	2.46
26	990	0.92	---	1.14	1.14	1.06	1.06
27	910	1.85	1.85	1.70	1.70	1.76	1.76
28	890	7.41	7.41	---	---	2.82	2.82
29	850	---	---	2.84	2.84	1.76	1.76
30	810	---	---	1.70	1.70	1.06	1.06
31	800	---	---	1.70	1.70	1.06	1.06
32	710	---	---	0.57	---	0.35	---
33	700	0.92	---	---	---	0.35	---
34	690	0.92	---	0.57	---	0.70	0.70
35	680	---	---	1.70	1.70	1.06	1.06
36	640	0.92	---	0.57	---	0.70	0.70
37	620	0.92	---	---	---	0.35	---
38	610	0.92	---	---	---	0.35	---
39	590	0.92	---	---	---	0.35	---
40	550	0.92	---	---	---	0.35	---
41	520	0.92	---	---	---	0.35	---
42	490	1.85	1.85	---	---	0.70	0.70
43	470	5.55	5.55	---	---	2.11	2.11
44	450	---	---	4.54	4.54	2.82	2.82
45	420	12.96	12.96	5.11	5.11	8.10	8.10
46	400	6.48	6.48	3.98	3.98	4.93	4.93
47	390	---	---	5.11	5.11	3.17	3.17
48	380	---	---	0.57	---	0.35	---
49	370	---	---	2.27	2.27	1.41	1.41
50	340	---	---	0.57	---	0.35	---
51	270	0.92	---	---	---	0.35	---
52	180	4.63	4.63	0.57	---	2.11	2.11
53	160	2.78	2.78	2.27	2.27	2.46	2.46
54	150	3.70	3.70	2.27	2.27	2.82	2.82
55	130	---	---	0.57	---	0.35	---
56	120	---	---	3.98	3.98	2.46	2.46

filamentosos, incluido *C. acutatum* (Katan, 2000; Wharton & Diéguez, 2004), la fusión de las hifas (anastomosis) entre cepas compatibles, es un requisito para que este evento ocurra, aunque existen evidencias que aun en interacciones incompatibles es posible el intercambio de material genético (Collins y Saville, 1990). La anastomosis es controlada por un proceso denominado incompatibilidad vegetativa o heterocariótica (Glass *et al.*, 2000). Cuando la anastomosis ocurre entre cepas incompatibles se produce muerte celular de las hifas fusionadas. En ascomicetos filamentosos, las bases genéticas de la incompatibilidad están dadas por diferencias entre alelos de loci *het*, los cuales pueden ser multialélicos (Rodríguez *et al.*, 2004).

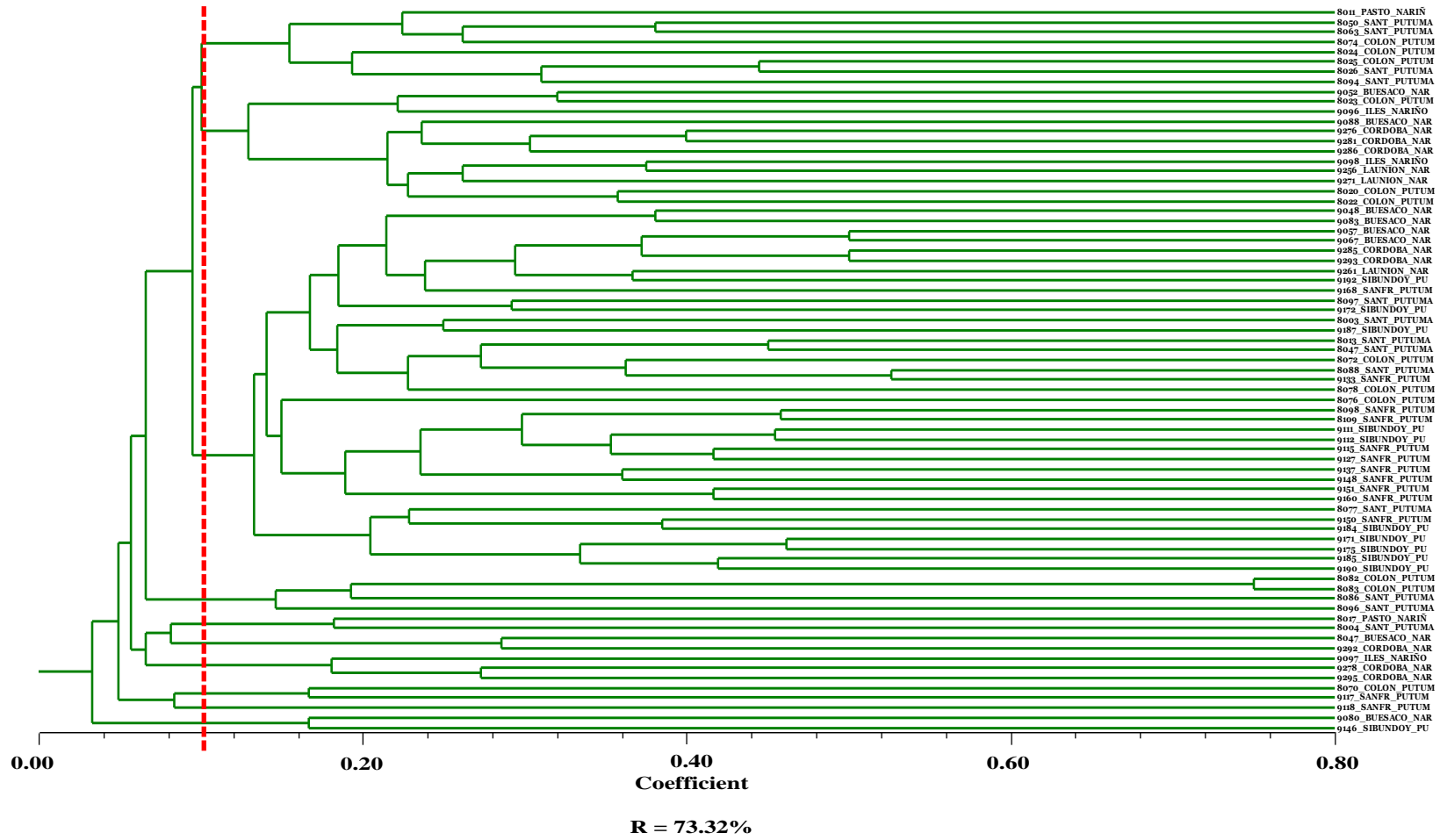


Figura 22. Distribución de los 73 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* procedentes de Nariño y Putumayo mediante ADN Polimórfico Amplificado al Azar, RAPDs, en función de sus patrones génicos. Dendrograma consenso construido usando el método de promedios no ponderados (UPGMA) y el empleo del coeficiente de Jaccard, valor $r=0.7101$.

El análisis de diversidad genética a partir de los datos moleculares generados mediante RAPDs muestran que *C. acutatum* es un patógeno altamente variable genotípicamente, mediante análisis de varianza molecular se determinó que el 95.77% de la diversidad genética se debe a la variación dentro de las dos poblaciones estudiadas en comparación con el 4.23% correspondiente a la variación entre las dos regiones de estudio (Nariño y Putumayo). No se observó una diferenciación genética significativa entre las dos regiones con un índice de fijación (F_{TS}) del 0.04226 (Tabla 21), indicando que ambas son similares y presentan frecuencias alélicas iguales.

Tabla 21. Resumen del análisis de la varianza molecular de dos poblaciones de *Colletotrichum acutatum* (Nariño y Putumayo) evaluadas mediante ADN Polimórfico amplificado al azar.

Fuente de variación	Suma de los cuadrados	Componentes de varianza	Variación porcentual	F_{TS}	P-valor
Entre las poblaciones	45.097	0.41086	4.22623	0.04226	0.00000
Dentro de las poblaciones	1322.136	9.31082	95.77377		
Total	1367.233	9.72168	100 %		

En este estudio se encontró una alta variabilidad genotípica intraespecífica (95,77%) en *C. acutatum*, a pesar de estar limitado en su capacidad de generar variación debido a su reproducción de tipo asexual. Esta alta variación dentro de las poblaciones puede explicarse debido a la existencia de diferentes mecanismos de generación de variabilidad genética como los mencionados anteriormente: mutaciones (de cromosoma, por inserción o eliminación de fragmentos de ADN, o transposones), el flujo de genes en las poblaciones (local o a largas distancias) y la recombinación (sexual o asexual).

Este tipo de variación puede ser continua o discontinua. La variación continua se presenta cuando se observa diferencia entre dos extremos de una población de patógenos, pero la diferencia entre los individuos es muy sutil. Por el contrario, la mutación discontinua ocurre cuando la expresión del cambio tiene efectos determinantes (Carlile & Watkinson, 1996). En el caso de *Colletotrichum acutatum* el tipo de variación que presenta es continua debido a que la diferencia fenotípica entre los individuos no es notoria, sin embargo existe una alta variabilidad intraespecífica.

En cuanto a las mutaciones es importante tener en cuenta que el genoma de diferentes hongos fitopatógenos está constituido por alrededor de 10.000 genes (Carlile & Watkinson, 1996) y su frecuencia de mutación varía mucho. La intensidad con que una mutación altera la diversidad de la población de un patógeno depende de la tasa de

mutación, el nivel de ploidía del organismo (haploide, diploide o dicariótico), el tamaño de la población y las ventajas adaptativas del fenotipo mutante (Burdon, 1992). Por otro lado, es importante tener en cuenta 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; 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 (McDonald & Linde, 2002).

Con relación al flujo de genes, esta es quizá la fuente de variabilidad más fácil de identificar. El proceso de migración conduce a la aparición de nuevos patotipos en áreas donde previamente estuvieron ausentes (Araya, 2003). En Colombia, en particular los departamentos de Nariño y Putumayo 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 (Lobo, 2002). El hecho de 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 el flujo de genes, la difusión de enfermedades y la existencia de materiales heterogéneos tanto de la planta como de los posibles fitopatógenos.

La recombinación también se puede lograr por medio de hibridación somática en hongos, o por parasexualismo en algunas bacterias (Katan, 2000; Wharton & Diéguez, 2004). El parasexualismo es un proceso generador de variabilidad sin que medien verdaderos procesos sexuales. Este sistema se da entre los hongos que no se reproducen sexualmente o en los que la reproducción sexual es poco frecuente. Aunque este mecanismo produce variabilidad genética en forma menos eficiente que una verdadera reproducción sexual es de primordial importancia para la variabilidad genotípica de organismos en la que no es frecuente la reproducción sexual o son de tipo asexual (Arauz, 1998). La recombinación asexual también ha sido observada en *Colletotrichum* con la formación de tipos especiales de hifas que crean anastomosis directa entre las conidias (Roca *et al.*, 2004; Roca y Wheals, 2005).

Determinar la diversidad patogenética en organismos tan variables como *Colletotrichum acutatum* debe ser una labor permanente en los programas de mejoramiento. La pérdida de la resistencia a enfermedades en cultivares comerciales, causado por el surgimiento de patotipos originalmente ausentes o con muy baja representación, no es un fenómeno nuevo o inesperado; existen antecedentes que demuestran la alta frecuencia con que se puede presentar, muchas veces inducida por el hombre. La variabilidad genética es una condición presente y que paulatinamente se ha ido incrementado en los agroecosistemas (Araya, 2003) debido a la alteración genética de los cultivos introducida por el mejoramiento dirigido, la ampliación de las fronteras agrícolas, la introducción de cultivos a nuevas regiones y el uso desmedido de plaguicidas sistémicos. Estos factores aumentan

la fuerza de selección ejercida sobre las poblaciones de patógenos favoreciendo la expresión de nuevos genes de virulencia y polimorfismos en la estructura de las poblaciones (Rivera, 2007), que además podrían estar siendo beneficiados por las condiciones geográficas y climáticas propias de los sitios de procedencia y a los diferentes cultivares y/o variedades del hospedero.

Es importante resaltar la posibilidad de encontrar recombinación sexual entre los aislamientos de *Colletotrichum acutatum*, Guerber y Correl en el 2001, reportaron la recombinación sexual entre los aislamientos del hongo y la generación del teleomorfo, *Glomerella acutata* en cultivo, 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.

Probablemente la gran plasticidad genómica puesta de manifiesto entre los aislamientos de *Colletotrichum*, contribuya al aumento de la capacidad adaptativa de las cepas a las condiciones de campo, lo que dificulta el control de la enfermedad causada por este fitopatógeno (Espinosa, 2006).

5.2 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

A partir de características morfológicas y fisiológicas del fruto (diámetro, peso, sólidos solubles totales medidos en grados brix en campo a la cosecha y acidez titulable) se obtuvo el fenograma presentado en la figura 26, del cual se seleccionaron 9 genotipos de los diferentes cultivos de Santiago (Putumayo) y 2 de la Laguna (Nariño) (PL y PL2) abarcando la mayor variación fenotípica.

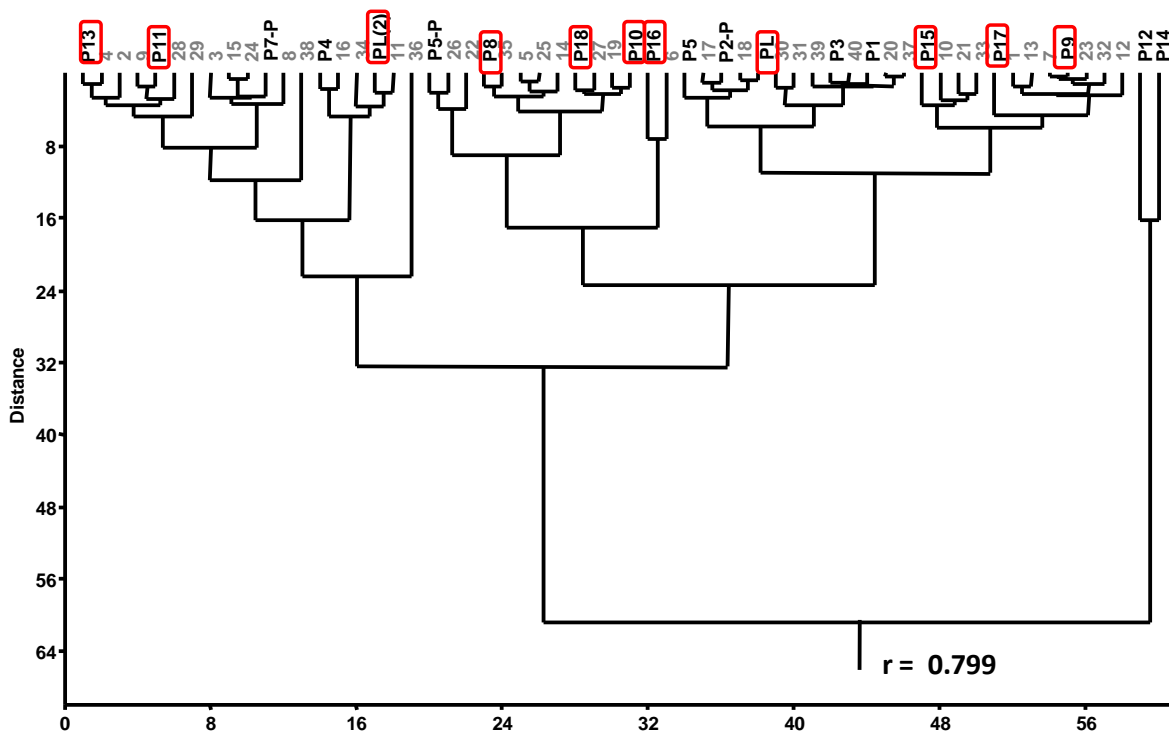


Figura 23. Agrupamiento de genotipos de Tomate de acuerdo a sus características fenotípicas. En rojo los genotipos seleccionados para este estudio.

Estas pruebas se realizaron aplicando los postulados de Robert Koch, los cuales sirven para indicar si el organismo aislado es o no el causante de la enfermedad (Volcy, 2008); en este caso, permiten conocer si los aislamientos del hongo a probar inducen síntomas de Antracnosis en tomate de árbol.

Durante las primeras 24h posteriores a la inoculación, no se evidenciaron síntomas de la infección lo cual se relaciona con el carácter hemibiotrófico del patógeno. Los primeros síntomas se identificaron como puntos necróticos pequeños y superficiales de color café a negro, que en algunos casos ocasionaron un hundimiento de la superficie evidenciada a partir del sexto día (Figura 27) mientras que la aparición de masas conidiales se observó a partir del noveno día de inoculación. En algunos frutos el avance de la infección durante los días 9, 12 y 15, generó lesiones bien definidas que demuestran la colonización del tejido por parte del patógeno (Figura 28). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Aranzazu y Rondón en 1999 quienes afirman que el desarrollo de los síntomas es muy rápido, lo mismo que la capacidad de generar inóculo, pues del síntoma que comúnmente conocen los agricultores como "mancha necrótica", a esporulación, el lapso de tiempo es muy corto. Este comportamiento explica por qué muchas veces con aplicaciones

semanales de fungicidas protectantes y remoción semanal de frutos enfermos, los niveles de infección no se modifican ni bajan, especialmente en época de invierno.

En tomate de árbol, esta enfermedad se presenta en cualquier estado de desarrollo del fruto y también, ataca ramas, brotes, hojas, pedúnculos, racimos florales, flores y frutos. En las hojas, especialmente en las más viejas se producen por el envés manchas con anillos concéntricos de color oscuro y bordes definidos. En los frutos, principalmente el fruto ya formado en distintos estados de su desarrollo, los síntomas se inician con una decoloración y lesiones pequeñas de apariencia aceitosa, que gradualmente se tornan pardas o negras con bordes bien definidos, acompañados de un ligero hundimiento (Aranzazu y Rondón, 1999). Cuando las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de la enfermedad (humedad relativa alta, bajas temperaturas y precipitación continua) se produce la proliferación de esporas del hongo, que con el tiempo, se secan y momifican los frutos, pudiendo caer al suelo o permanecer adheridos al árbol. A veces las manchas son rodeadas de una tonalidad amarillenta y se presenta maduración prematura y finalmente caída del fruto. También se afectan los cogollos y ramas débiles causando necrosis apical (Aranzazu y Rondón, 1999; Tamayo, 2001).



Figura 24. Primeros síntomas de la infección por *Colleotrichum* spp. en los genotipos evaluados



Figura 25. Avance de la infección por *Colleotrichum* spp. en los genotipos evaluados.

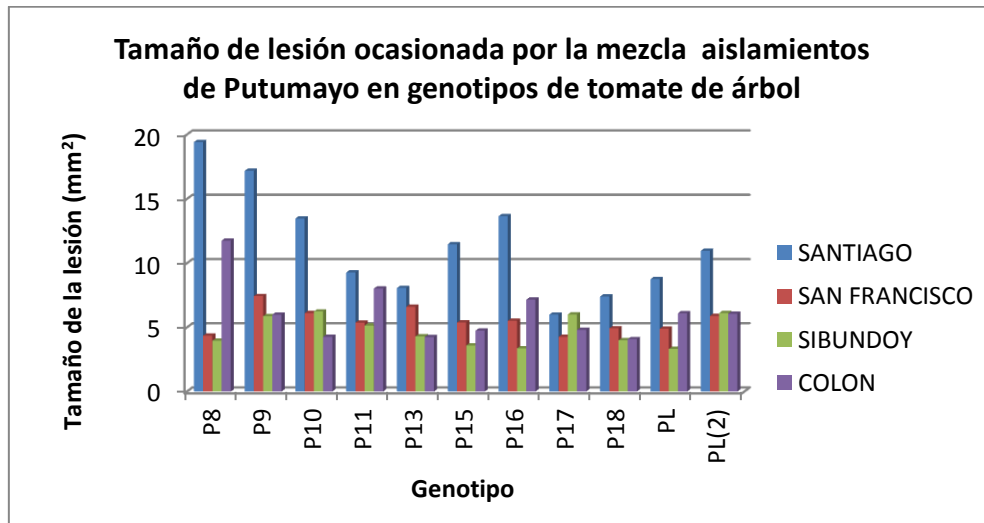
5.2.1 Tamaño de la lesión. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en frutos en dos estados fisiológicos: verde y pintón, el tamaño de lesión máximo evaluado el día 15 de los frutos pintones se presentó en el genotipo P8 al ser inoculado con la mezcla de aislamientos del municipio de Santiago (19.41 cm²) y, en el genotipo PL al ser inoculado con la mezcla de aislamientos de La Unión (9.65 cm²). El menor tamaño de lesión se presentó en el genotipo PL al ser inoculado con la mezcla de Sibundoy (3.32 cm²) y en el genotipo P17 inoculado con la mezcla de aislamientos provenientes de Buesaco (0.35 cm²) (Figura 29).

En cuanto a los frutos verdes, el tamaño de la lesión máximo se presentó en el genotipo P18 al ser inoculado con la mezcla de aislamientos procedentes del municipio de Santiago (14.79 cm²), y en el genotipo P8 al ser inoculado con la mezcla de aislamientos de Pasto (11.56 cm²). El menor tamaño de lesión se presentó en el genotipo P18 para la mezcla de aislamientos de Sibundoy (0.52 cm²) y en el genotipo P13 inoculado con mezcla de aislamientos provenientes del municipio de Buesaco (0.69 cm²) (Figura 30).

Como se puede apreciar tanto en frutos verdes como en pintones, los aislamientos más agresivos evaluados según el tamaño de la lesión después de 15 días de haber sido inoculados fueron los aislamientos de Santiago en el caso de Putumayo y los de Pasto y la Unión para Nariño y los menos agresivos los de Sibundoy y Buesaco respectivamente. Esto concuerda con algunos estudios de patogenicidad de *Colleotrichum* en tomate de árbol, que indican que existen aislamientos de diferentes regiones del país que son más agresivos que otros, posiblemente por el permanente intercambio de producto comercial que desarrolla infecciones en postcosecha o que es usado entre regiones como material de semilla, además de la tolerancia que se ha inducido al patógeno por el uso excesivo de productos químicos para su control (Afanador *et al.* 2003). Además, como se mencionó anteriormente, esta enfermedad se presenta en cualquier estado de desarrollo del fruto y cuando las condiciones climáticas son favorables para su desarrollo se produce la proliferación de esporas del hongo (Aránzazu y Rondón, 1999; Tamayo, 2001).

Por otra parte, al analizar estos datos teniendo en cuenta el grado de reacción de los genotipos frente a la infección, se puede ver como no existe una tendencia definida, pues en el mismo genotipo que al ser inoculado con una mezcla determinada de aislamientos presenta el mayor tamaño de la lesión, al ser inoculado con una mezcla de aislamientos procedentes de otro municipio presenta el menor tamaño de lesión. Lo que podría indicar que más que hablar del grado de reacción del genotipo frente a la infección se debe hablar del grado de agresividad de los diferentes aislamientos en los genotipos evaluados.

A.



B.

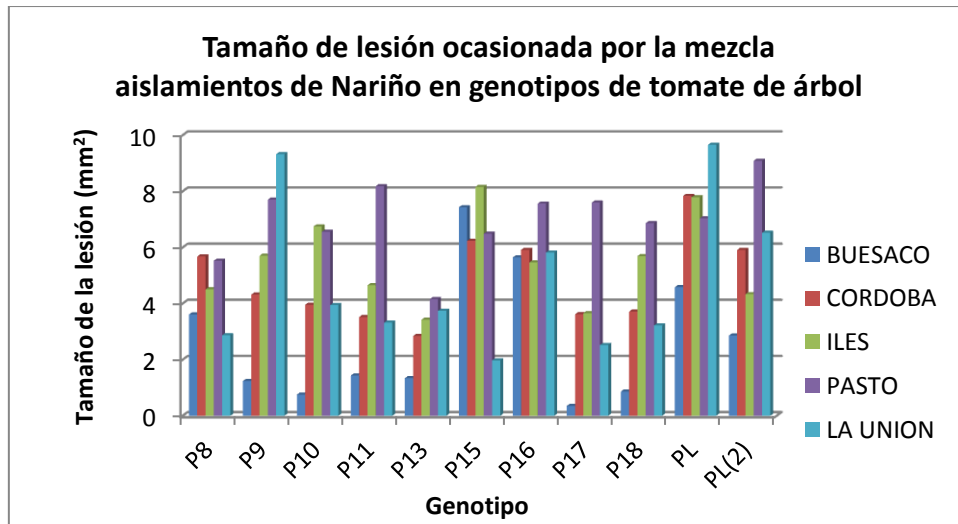
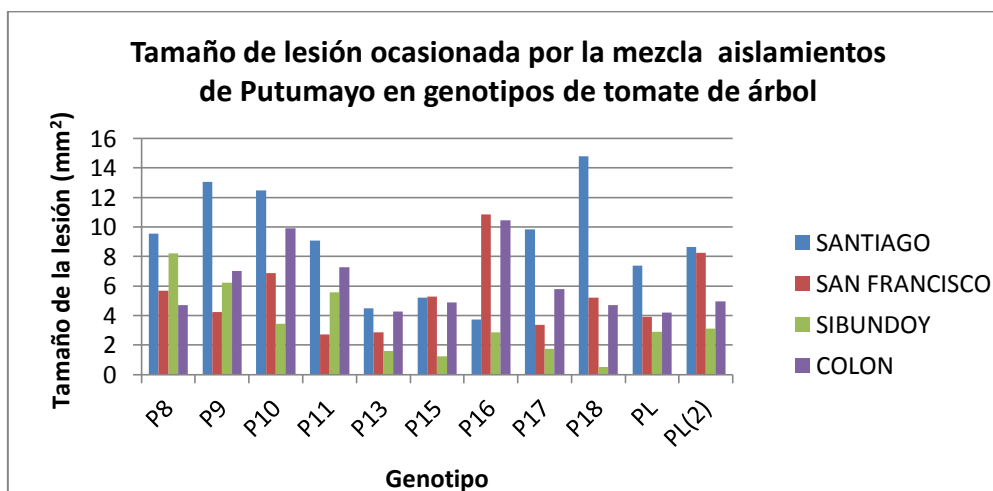


Figura 26. Tamaño de la lesión ocasionada por (en milímetros) la mezcla de aislamientos provenientes de los departamentos de Putumayo (A) y Nariño (B) inoculada en frutos pintones de tomate de árbol.

A.



B.

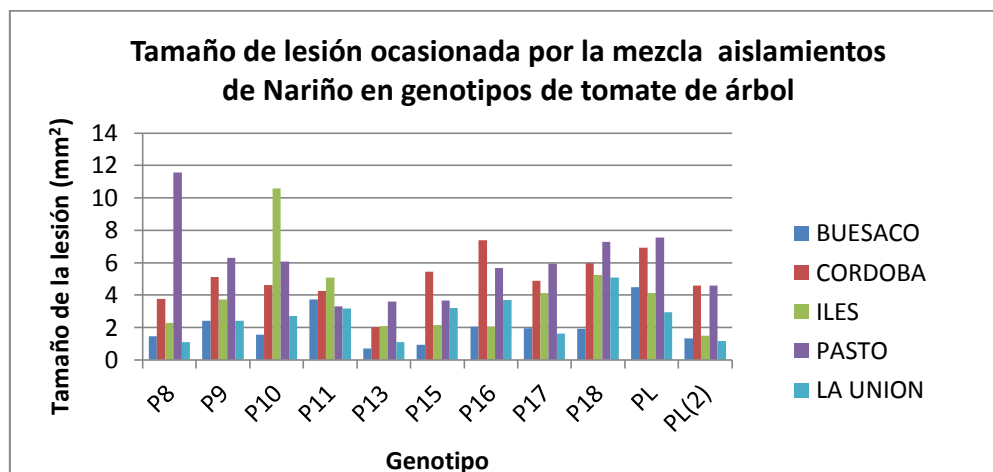


Figura 27. Tamaño de la lesión ocasionada por (en milímetros) la mezcla de aislamientos provenientes de los departamentos de Putumayo (A) y Nariño (B) inoculada en frutos verdes de tomate de árbol.

Al realizar un análisis de varianza multifactorial para el tamaño de la lesión en los frutos pintones inoculados con los aislamientos de Nariño y Putumayo se encontró que existen diferencias significativas entre genotipos (p -valor < 0.05) y entre mezcla de aislamientos (p -valor < 0.05) pero que el tamaño de la lesión no se ve afectada por la interacción entre mezcla de aislamientos y genotipos (p -valor > 0.05) (Tabla 22). La comparación de medias de Tukey por mezcla de aislamientos permitió identificar seis grupos (Tabla 23), entre los cuales se destaca Santiago, mezcla que presentó el tamaño de lesión más grande y Buesaco con un tamaño de lesión menor. Al realizar el mismo análisis por genotipo se identificaron dos grupos (Tabla 24), destacándose el genotipo P13 porque al ser infectado con las diferentes mezclas de aislamientos fue el que presentó menor tamaño de lesión.

Tabla 22. Análisis de Varianza para tamaño de lesión en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.

Fuente	Grados de libertad	Error Tipo I	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
MEZCLA DE AISLAMIENTOS	8	5.03457043	0.62932130	14.36	<.0001
GENOTIPO	10	1.22777221	0.12277722	2.80	0.0028
MEZCLA DE AISLAMIENTOS *GENOTIPO	80	3.76303456	0.04703793	1.07	0.3924

Tabla 23. Prueba de Múltiple Rangos por mezcla de aislamientos para tamaño de lesión en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Mezcla de aislamientos	Media	N	Grupo Tukey
Santiago	0.96550	33	A
Colón	0.84943	33	B A
Pasto	0.82365	33	B A C
San Francisco	0.78966	33	B D C
Córdoba	0.78632	33	B D C
Iles	0.68358	33	E D C
Sibundoy	0.65538	33	E D F
La Unión	0.55496	33	E F
Buesaco	0.51083	33	F

Tabla 24. Prueba de Múltiple Rangos por genotipo para tamaño de lesión en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Genotipo	Media	N	Grupo Tukey
P10	0.82963	27	A
P18	0.81434	27	A
P9	0.79602	27	A
P15	0.74133	27	A B
PL	0.74010	27	A B
P17	0.73903	27	A B
P16	0.73549	27	A B
P11	0.72158	27	A B
P8	0.71670	27	A B
PL(2)	0.67571	27	A B
P13	0.58034	27	B

Para el caso de los frutos verdes se encontró que el tamaño de la lesión es afectado por los genotipos (p -valor < 0.05), la mezcla de aislamientos (p -valor < 0.05) y la interacción

entre mezcla de aislamientos y genotipos (p -valor < 0.05) (Tabla 25). Al realizar la comparación de medias de Tukey, para la interacción, se estableció que el tamaño de la lesión fue similar en todos los genotipos, excepto en P8, PL y P13, al ser inoculados con la mezcla de aislamientos de Iles, los cuales presentaron valores bajos para esta variable, 0.517mm^2 , 0.498mm^2 y 0.471mm^2 respectivamente, en comparación con el genotipo P10, el cual tiene un valor de $1,060\text{mm}^2$ (Tabla 26).

Las diferencias en los frutos pintones se pueden atribuir separadamente al patógeno o al hospedero, lo cual concuerda con lo reportado en un estudio realizado por Corpoica en 1999, con tres materiales de tomate de árbol (rojo común, tamarillo y amarillo) los cuales presentaron una reacción diferente a cada aislamiento del hongo, y cada material en particular respondió también de manera diferente a todos los aislamientos. Dodd *et al.* (1991) consideran que las diferencias en la patogenicidad de una cepa pueden ser consecuencia de las interacciones con el medio ambiente, la secreción de enzimas del hongo y el genotipo del hospedero.

Tabla 25. Análisis de Varianza para tamaño de lesión en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.

Fuente	Grados de libertad	Error Tipo I	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
MEZCLA DE AISLAMIENTOS	8	15.69914504	1.96239313	4.00	0.0002
GENOTIPO	10	27.75244993	2.77524499	5.66	<.0001
MEZCLA DE AISLAMIENTOS *GENOTIPO	80	78.16249085	0.97703114	1.99	<.0001

Tabla 26. Prueba de Múltiple Rangos interacción MEZCLA DE AISLAMIENTOS-GENOTIPO para tamaño de lesión en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

	Santiago	San Francisco	Sibundoy	Colón	Buesaco	Córdoba	Iles	Pasto	La Unión
P10	A	P16	A	P8	A	P9	A	PL	A
P18	A	PL2	A	P9	A	P16	A	P13	A
P17	A	P15	A	P18	A	P10	A	P9	A
P9	A	P10	A	P11	A	PL2	A	P18	A
PL2	A	P8	A	P10	A	P11	A	P16	A
PL	A	P17	A	PL2	A	P15	A	P11	A
P11	A	P18	A	P16	A	P17	A	P17	A
P8	A	PL	A	P17	A	P8	A	P10	A
P15	A	P9	A	PL	A	PL	A	P15	A
P13	A	P11	A	P13	A	P18	A	PL2	A
P16	A	P13	A	P15	A	P13	A	P8	A

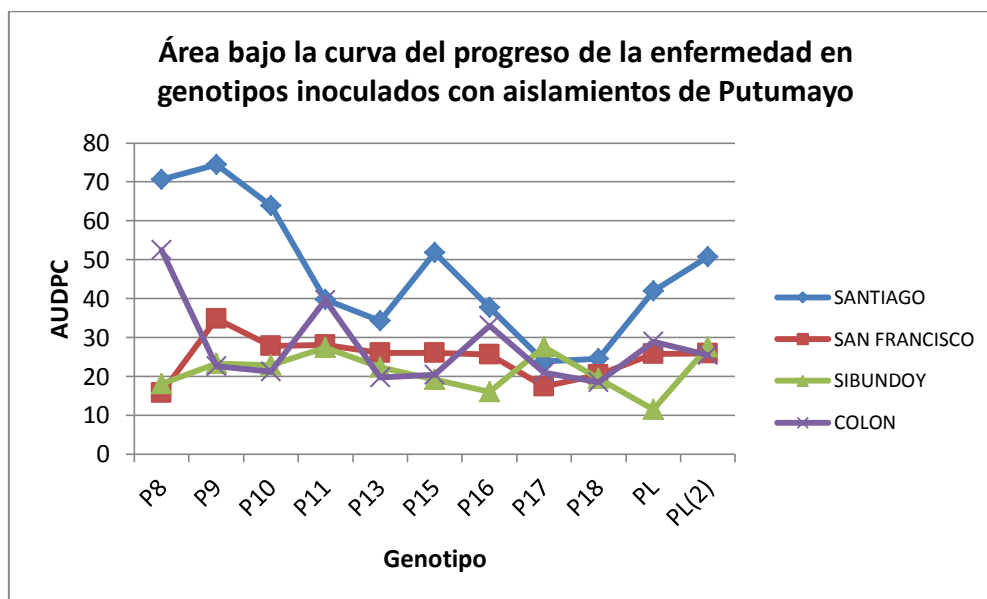
Comparador de Tukey =0,542

5.2.2 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad-AUDPC. Al analizar el valor de AUDPC (Area Under Disease Progressive Curve), el cual estima el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, se encontró que los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* presentan diferentes grados de agresividad en el caso de los frutos pintones, el valor de AUDPC máximo se presentó en el genotipo PL (44.32) al ser inoculado con la mezcla de aislamientos de Iles y en el genotipo P9 (74.40) inoculado con la mezcla de aislamientos del municipio de Santiago y el valor de AUDPC mínimo se presentó en el genotipo P17 (1.32) inoculado con la mezcla de aislamientos de Buesaco y en el genotipo PL (11.46) inoculado con la mezcla de aislamientos de Sibundoy (Figura 31).

En cuanto a los frutos verdes (Figura 32), el valor de AUDPC máximo se presentó en el genotipo P16 (46.46) inoculado con la mezcla de aislamientos de Córdoba y en el genotipo P10 (62.2) inoculado con la mezcla de aislamientos del municipio de Santiago y el valor mínimo se presentó en el genotipo P17 (5.19) inoculado con la mezcla de aislamientos de La Unión y en el genotipo P8 (2.16) inoculado con la mezcla de aislamientos del municipio de Sibundoy.

Al realizar un análisis general se puede decir que la mezcla de aislamientos más agresiva fue la que proviene del municipio de Santiago en el caso de Putumayo e Iles, Córdoba y Pasto para Nariño (valores de AUDPC más altos) y los menos agresivos los provenientes de Sibundoy (Putumayo) y Buesaco y la Unión (Nariño).

A.



B.

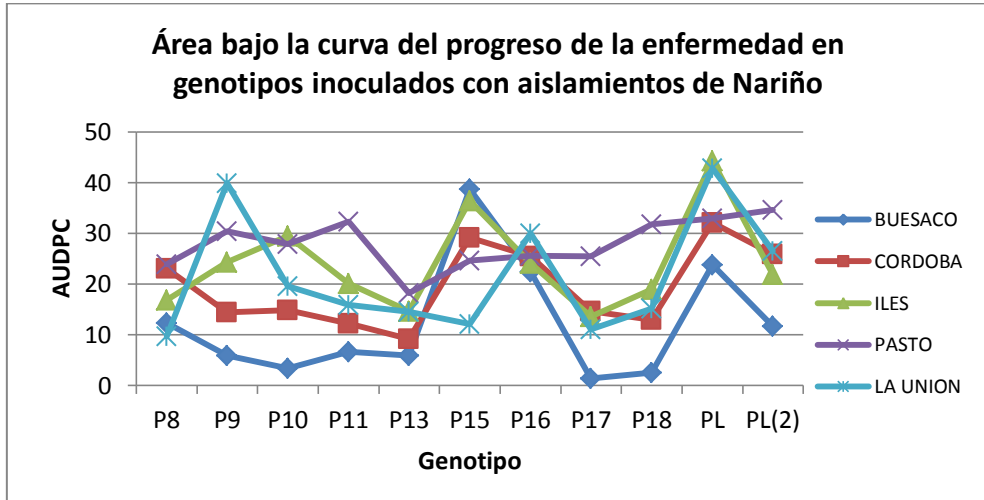
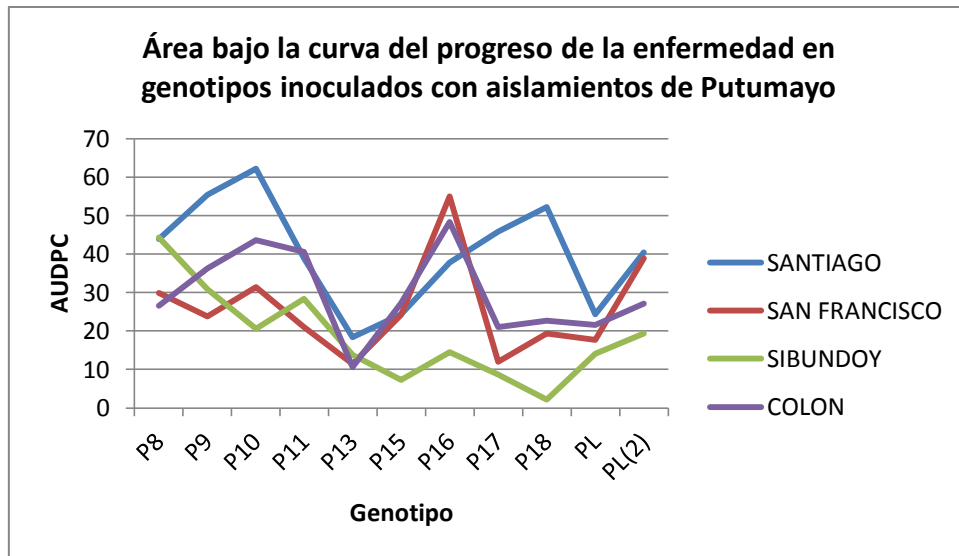


Figura 28. Tasa de crecimiento (AUDPC) de los aislamientos provenientes de los departamentos Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos pintones de tomate de árbol.

A.



B.

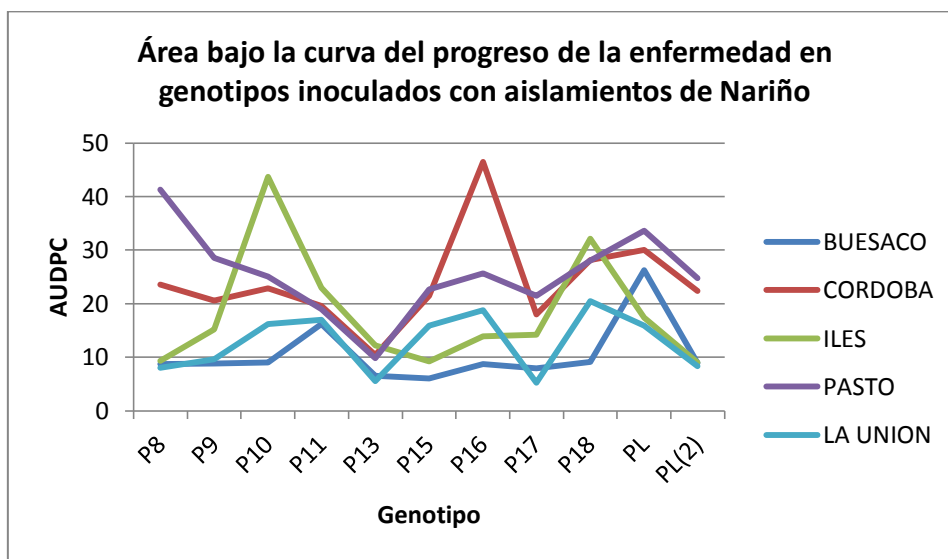


Figura 29. Tasa de crecimiento (AUDPC) de los aislamientos provenientes de los departamentos Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos verdes de tomate de árbol.

Al realizar un análisis de varianza para AUDPC en los frutos pintones y verdes inoculados con los aislamientos de Nariño y Putumayo se encontró que el valor de esta variable en los dos estados fisiológicos se ve afectado por el genotipo (p -valor < 0.05) y la mezcla de aislamientos (p -valor < 0.05) pero no por la interacción entre los dos (Tablas 27 y 30). A través de la comparación de medias de Tukey, para los frutos pintones, se encontró que la mezcla de aislamientos de Santiago se destaca por su agresividad con una media de 1.57847 (Tabla 28), a pesar de tener valores similares a Pasto, Colón, Córdoba y San Francisco, mientras que la mezcla de aislamientos de Buesaco presenta los valores de agresividad mas bajos siendo superada en promedio por las demás mezclas de aislamientos. Al realizar la misma comparación por genotipo se encontró el genotipo P13 presenta el valor mas bajo de infección siendo superados por P10 el cual presenta un valor de infección alto (Tabla 29).

En el caso de los frutos verdes, al igual que lo ocurrido con los frutos pintones, la mezcla de aislamientos de Santiago se destaca por su agresividad a pesar de tener valores similares a la mezcla de aislamientos de Colón, Pasto y San Francisco mientras que Buesaco presenta los valores de agresividad mas bajos siendo superada en promedio por las demás mezclas de aislamientos excepto la de La Unión (Tabla 31). En cuanto a los genotipos en el P13 se presentan los valores más bajos de AUDPC (Tabla 32).

Tabla 27. Análisis de Varianza para AUDPC en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.

Fuente	Grados de libertad	Error Tipo I	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
MEZCLA DE AISLAMIENTOS	8	7.14451009	0.89306376	14.78	<.0001
GENOTIPO	10	2.21145248	0.22114525	3.66	0.0006
MEZCLA DE AISLAMIENTOS *GENOTIPO	80	6.32879842	0.07910998	1.31	0.6938

Tabla 28. Prueba de Múltiple Rangos por mezcla de aislamientos para AUDPC en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD.

Mezcla de aislamientos	Media	N	Grupo Tukey
Santiago	1.57847	33	A
Colón	1.48817	33	A
Pasto	1.41649	33	B A
San Francisco	1.40672	33	B A
Córdoba	1.38887	33	B A
Sibundoy	1.27976	33	B C
Iles	1.25010	33	B C
La Unión	1.14142	33	D C
Buesaco	1.05716	33	D

Tabla 29. Prueba de Múltiple Rangos por genotipo para AUDPC en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Genotipo	Media	N	Grupo Tukey
P10	1.45987	27	A
P9	1.39096	27	A
P18	1.38259	27	A
P15	1.36570	27	A
P16	1.35790	27	A
P11	1.34290	27	A B
P8	1.34272	27	A B
PL	1.33331	27	A B
PL(2)	1.32646	27	A B
P17	1.24445	27	A B
P13	1.12857	27	B

Tabla 30. Análisis de Varianza para ÁUDPC en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.

Fuente	Grados de libertad	Error Tipo I	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
MEZCLA DE AISLAMIENTOS	8	7.33746180	0.91718273	16.14	<.0001
GENOTIPO	10	1.98342657	0.19834266	3.49	0.0003
MEZCLA DE AISLAMIENTOS *GENOTIPO	80	4.37522292	0.05469029	0.96	0.5706

Tabla 31. Prueba de Múltiple Rangos por mezcla de cepas para AUDPC en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Mezcla de aislamientos	Media	N	Grupo Tukey
Santiago	1.57847	33	A
Colón	1.48817	33	B A
Pasto	1.41649	33	B A C
San Francisco	1.40672	33	B A C
Córdoba	1.38887	33	B C
Sibundoy	1.27976	33	D C
Iles	1.25010	33	D C
La Unión	1.14142	33	E D
Buesaco	1.05716	33	E

Tabla 32. Prueba de Múltiple Rangos por genotipo para AUDPC en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

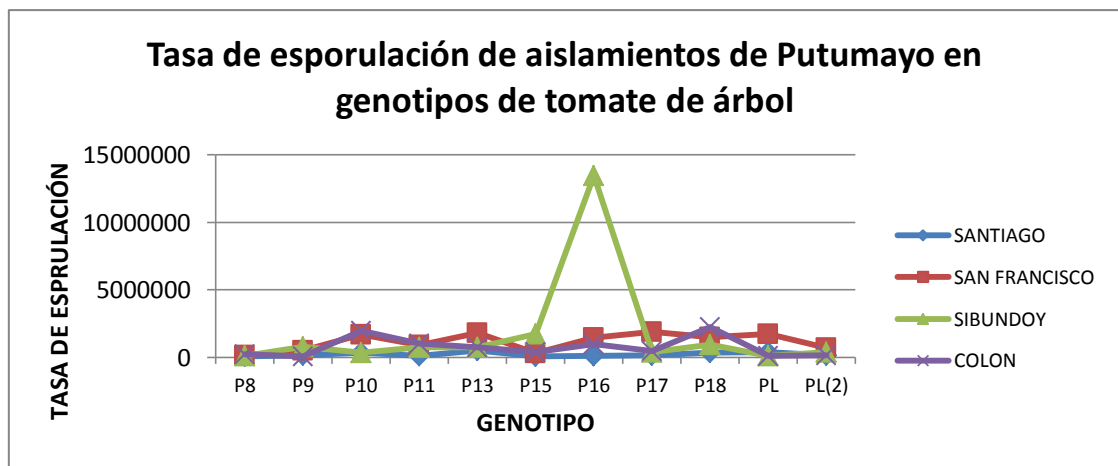
Genotipo	Media	N	Grupo Tukey
P10	1.45987	27	A
P9	1.39096	27	B A
P18	1.38259	27	B A
P15	1.36570	27	B A
P16	1.35790	27	B A
P11	1.34290	27	B A
P8	1.34272	27	B A
PL	1.33331	27	B A C
PL(2)	1.32646	27	B A C
P17	1.24445	27	B C
P13	1.12857	27	C

5.2.3 Tasa de esporulación. Con respecto a la tasa de esporulación (Figura 33 y 34), se observó una gran variabilidad en la producción de conidias entre los diferentes aislamientos y entre los genotipos tanto en frutos pintones como verdes. Mediante el análisis de varianza en frutos pintones y verdes se encontró que el valor de esta variable se ve afectada por la mezcla de aislamientos (p -valor < 0.05), los genotipos (p -valor < 0.05) y por la interacción entre mezcla de aislamientos y genotipos (p -valor < 0.05) (Tablas 33 y 35). Al realizar la comparación de medias de Tukey, en los frutos pintones, se observó un comportamiento diferencial de reacción de los genotipos frente a la mezcla de aislamientos de Sibundoy, Córdoba e Iles destacándose los genotipos P17 inoculado con la mezcla de aislamientos de Córdoba y PL inoculado con la mezcla de aislamientos de Iles porque en ellos se presentó el valor mas bajo de tasa de esporulación (2.413 y 2.422 respectivamente) (Tabla 34).

En el caso de los frutos verdes se observó un comportamiento diferencial de reacción de los genotipos frente a la mezcla de aislamientos de Sibundoy, Buesaco, Iles y La Unión destacándose el genotipo PL inoculado con la mezcla de aislamientos de Buesaco, Iles y La Unión porque en el se presentaron los valores mas bajos en comparación con los otros genotipos inoculados con las mismas mezclas de aislamientos (Tabla 36).

La gran variabilidad en la tasa de esporulación indica que su comportamiento se relaciona posiblemente con la respuesta defensiva del patógeno que es estimulada por la presencia de compuestos antifúngicos de la planta ya que las esporas son estructuras fundamentales para la supervivencia en condiciones hostiles (Plumbley *et al*, 1993), lo que concuerda con los trabajos desarrollados por Saldarriaga en el 2006, Corpoica en 1999 y Tamayo en 1990, quienes registran diferencias de patogenicidad cuando se realizan inoculaciones de una misma cepa o aislamiento del hongo sobre frutos de tomate de árbol procedentes de diferentes materiales o ecotipos; como también cuando se prueban diferentes cepas del hongo sobre un mismo material o ecotipo.

A.



B.

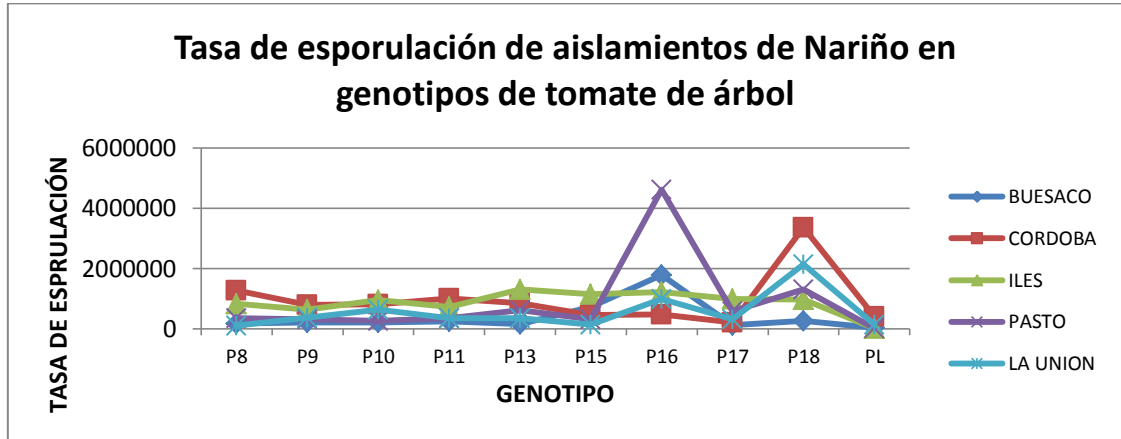
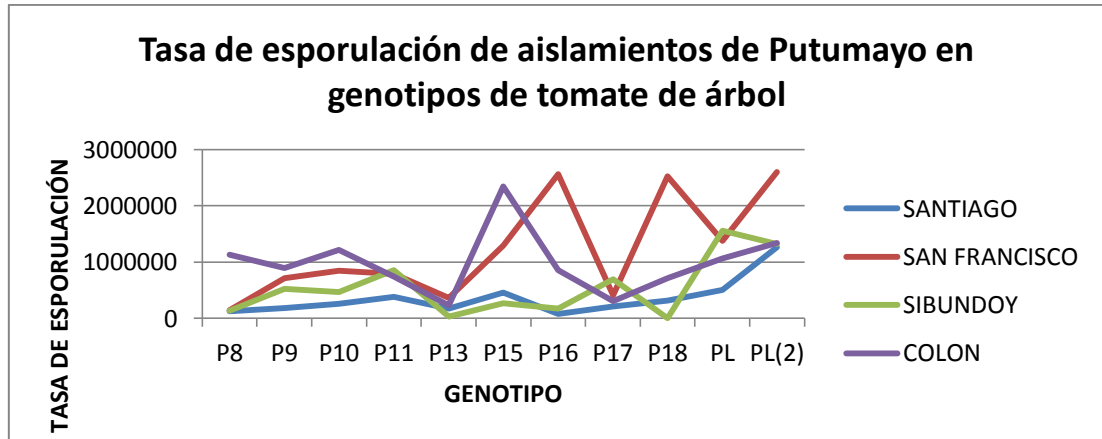


Figura 30. Tasa de esporulación de los aislamientos provenientes de los departamentos Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos pintones de tomate de árbol.

A.



B.

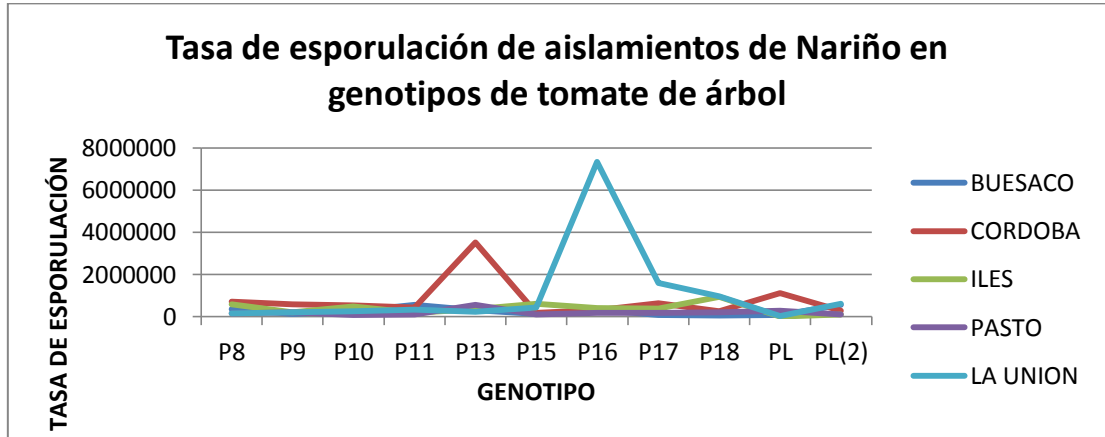


Figura 31. Tasa de esporulación de los aislamientos provenientes de los departamentos Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos verdes de tomate de árbol.

Tabla 33. Análisis de Varianza para Tasa de Esporulación en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.

Fuente	Grados de libertad	Error Tipo I	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
MEZCLA DE AISLAMIENTOS	8	15.69914504	1.96239313	4.00	0.0230
GENOTIPO	10	27.75244993	2.77524499	5.66	<.0001
MEZCLA DE AISLAMIENTOS *GENOTIPO	80	78.16249085	0.97703114	1.99	0.0003

Tabla 34. Prueba de Múltiple Rangos para Tasa de Esporulación para la interacción MEZCLA DE AISLAMIENTOS-GENOTIPO en frutos pintones inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

	Santiago	San Francisco	Sibundoy	Colón	Buesaco	Córdoba	Iles	Pasto	La Unión								
P18	A	PL	A	P16	A	P10	A	P8	A	P18	A	P16	A	P17	A	P18	A
PL	A	P18	A	P13	A B	P16	A	P17	A	P8	A B	P13	A	P13	A	P16	A
P13	A	P10	A	P11	A B C	P18	A	P18	A	P9	A B	P18	A	P18	A	P10	A
P9	A	P11	A	P18	A B C	P13	A	P11	A	P13	A B	P10	A	P9	A	P13	A
PL2	A	PL2	A	P15	A B C	P11	A	P16	A	P11	A B C	P8	A	P10	A	P11	A
P10	A	P13	A	P9	A B C	P17	A	P13	A	P15	A B C	PL2	A	P16	A	P17	A
P15	A	P9	A	P17	A B C	P8	A	PL2	A	P16	A B C	P17	A	PL2	A	P9	A
P11	A	P15	A	PL2	A B C	PL2	A	P9	A	PL	A B C	P9	A	P11	A	P15	A
P16	A	P8	A	P8	A B C	P15	A	P15	A	PL2	A B C	P15	A	P15	A	PL	A
P8	A	P17	A	PL	A B C	P9	A	PL	A	P10	C D	P11	A	P8	A	PL2	A
P17	A	P16	A	P10	C	PL	A	P10	A	P17	D	PL	B	PL	A	P8	A

Comparador de Tukey =1,840

Tabla 35. Análisis de Varianza para Tasa de Esporulación en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo.

Fuente	Grados de libertad	Error Tipo I	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
MEZCLA DE AISLAMIENTOS	8	22.9050461	2.8631308	2.30	0.0225
GENOTIPO	10	69.1063312	6.9106331	5.55	<.0001
MEZCLA DE AISLAMIENTOS *GENOTIPO	80	186.5203473	2.3315043	1.87	0.0002

Tabla 36. Prueba de Múltiple Rangos para Tasa de Esporulación para la interacción MEZCLA DE AISLAMIENTOS-GENOTIPO en frutos verdes inoculados con aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo. Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

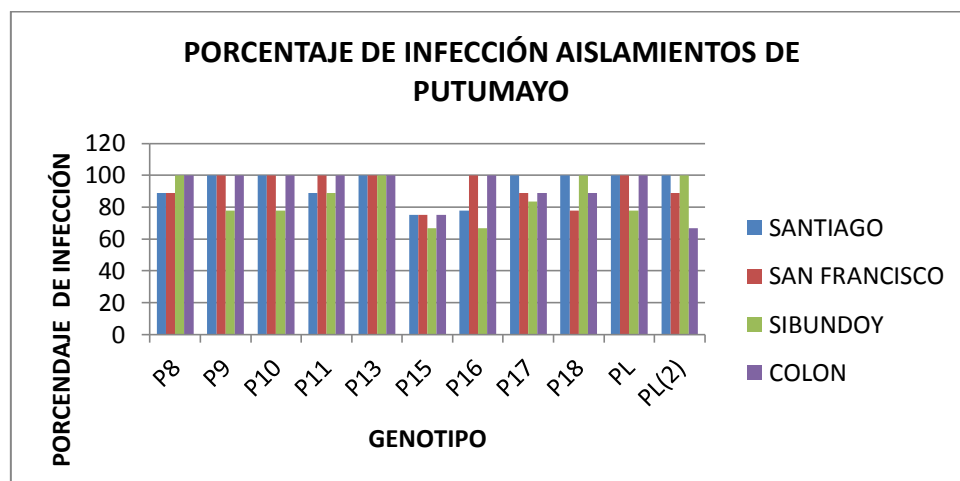
	Santiago	San Francisco	Sibundoy	Colón	Buesaco	Córdoba	Iles	Pasto	La Unión
PL2	A	P16	A	P11	A	PL2	A	P13	A
PL	A	PL	A	PL2	A B	P15	A	P15	A B
P18	A	PL2	A	P9	A B	P10	A	P16	A B
P11	A	P15	A	P10	A B	P16	A	P8	A B
P13	A	P18	A	P17	A B	P18	A	P17	A B
P10	A	P11	A	P8	A B	P11	A	P18	A B
P15	A	P10	A	P18	A B	P9	A	PL2	A B
P17	A	P13	A	PL	A B	P8	A	P10	A B
P9	A	P8	A	P16	A B C	P17	A	P9	A B
P16	A	P17	A	P15	A B C	P13	A	P11	A B
P8	A	P9	A	P13	C	PL	A	PL	C

Comparador de Tukey =2,93

5.2.4 Porcentaje de infección. Al realizar el análisis del porcentaje de infección no se encontraron diferencias significativas entre los frutos pintones (% de infección promedio 89.44) y los verdes (% de infección promedio 86.12), lo cual puede ser explicado porque los frutos en sus primeras etapas de desarrollo, aumentan progresivamente su tasa respiratoria, ya que esta, está ampliamente relacionada con la actividad bioquímica del mismo para lograr un crecimiento normal hasta llegar a su etapa de maduración, en este momento los frutos se encuentran susceptibles a enfermedades por el esfuerzo que deben realizar hasta llegar a la madurez fisiológica (Padrón, 1991). Esto concuerda con lo reportado por Saldarriaga *et al.*, en 1997 quien afirma que el hongo que causa la antracnosis también afecta hojas y ramas, pero el daño más notorio se observa en los frutos, los cuales son afectados en todos sus estados de desarrollo.

Al realizar el análisis de esta variable en los dos estados fisiológicos evaluados (Figura 35 y 36) se encontró que el menor valor, en frutos pintones, lo presentaron los genotipos P17 y PL-2 al ser inoculados con la mezcla de aislamientos de Buesaco y Colon respectivamente, mientras que en frutos verdes el menor valor lo presentó el genotipo P18, al ser inoculado con la mezcla de aislamientos de Sibundoy, y P13 con la mezcla de Buesaco. Estos resultados se pueden atribuir a la existencia de gran diversidad genética y heterogeneidad dentro de *C. acutatum* (Johnston & Jones, 1997; Lardner, *et al.*, 1999; Freeman, 2001), la cual puede ser explicada por una respuesta adaptativa a la presión de selección ejercida por su principal hospedero *Cyphomandra betacea*, genéticamente diverso, con una amplia diferenciación de variedades, lo cual contribuye a la selección de diferentes genotipos del patógeno (Milgroom, 1996; Wyand y Brown, 2003). Los hongos de plantas con frecuencia muestran una especialización patogénica con respecto a las especies y los cultivares hospederos. En los ambientes naturales y los agrícolas, esta especialización es dinámica, ya que pueden aparecer rápidamente nuevas razas con un rango de hospederos diferente (Orozco, 2006).

A.



B.

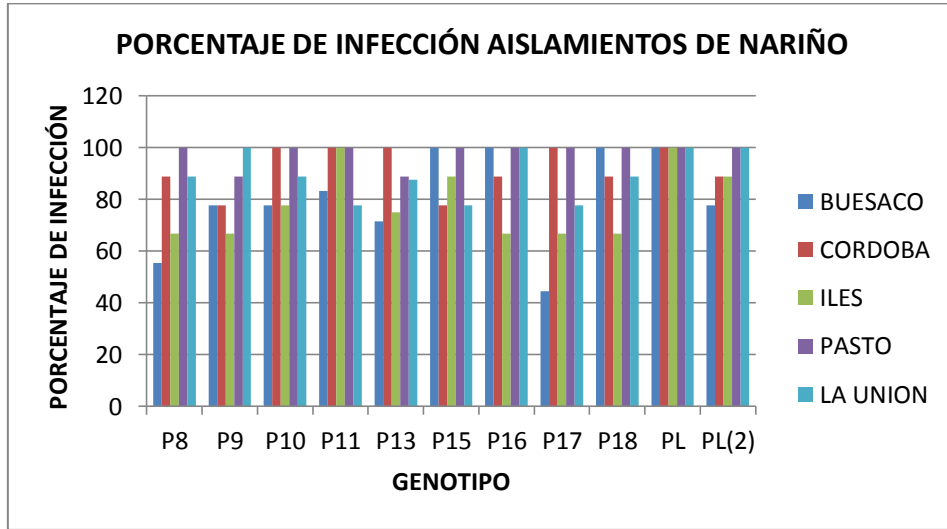
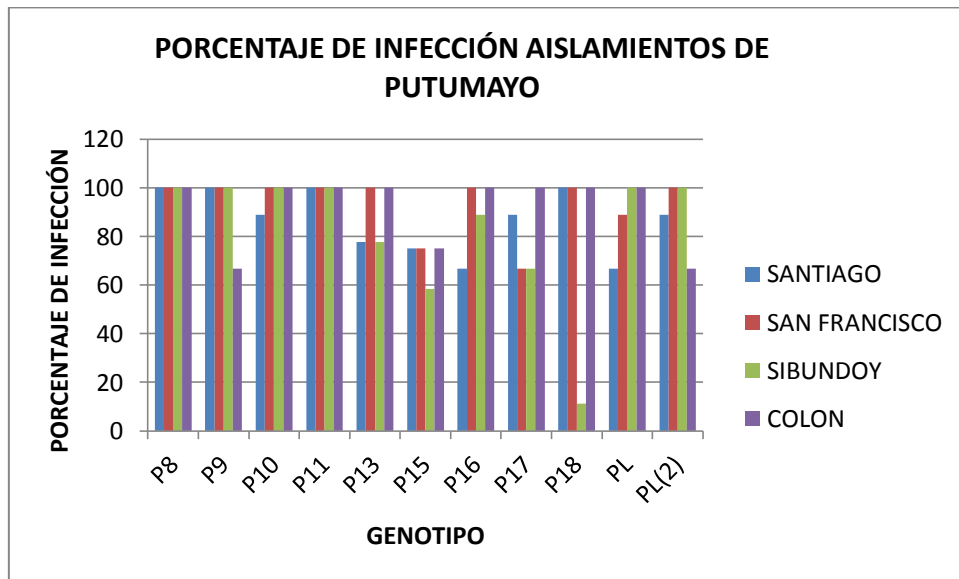


Figura 32. Porcentaje de infección de los aislamientos provenientes de los departamentos de Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos pintones de tomate de árbol.

A.



B.

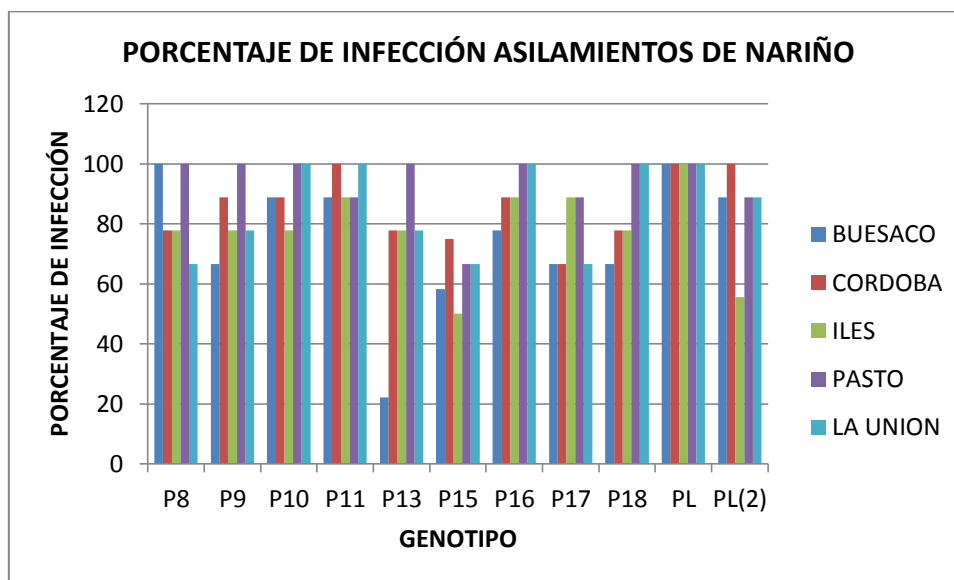


Figura 33. Porcentaje de infección de los aislamientos provenientes de los departamentos de Putumayo (A) y Nariño (B) inoculados en frutos verdes de tomate de árbol.

5.2.5 Fenogramas. Teniendo en cuenta los resultados, se elaboraron fenogramas para determinar la variación de los aislamientos y de los genotipos de acuerdo a las variables evaluadas, los cuales presentaron un coeficiente de correlación superior a 0.80 lo que indica un buen grado de adecuación entre la matriz básica de datos y los agrupamientos resultantes.

Los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* inoculados en frutos pintones y verdes formaron dos grupos de acuerdo a las variables evaluadas (Figuras 37 y 39), destacándose la mezcla de aislamientos de Buesaco para los frutos pintones y Sibundoy para los verdes por ser las menos agresivas. En cuanto a los genotipos (Figuras 38 y 40) se destacan los genotipos P16 y PL por presentar menor tamaño de lesión, lo que podría indicar una mejor respuesta del genotipo frente al ataque de *Colletotrichum acutatum*.

Los resultados obtenidos permiten establecer que no existe homogeneidad en las poblaciones presentándose una gran variabilidad en la patogenicidad de los aislamientos evaluados, lo cual se corrobora con lo presentado por Bailey y Jeger en 1992 quienes describen un elevado grado de variabilidad cultural, morfológica y patógena en ensayos *in vitro* de *C. gloeosporioides* y lo asocian con la plasticidad fenotípica y capacidad de adaptación de este patógeno a diferentes condiciones.

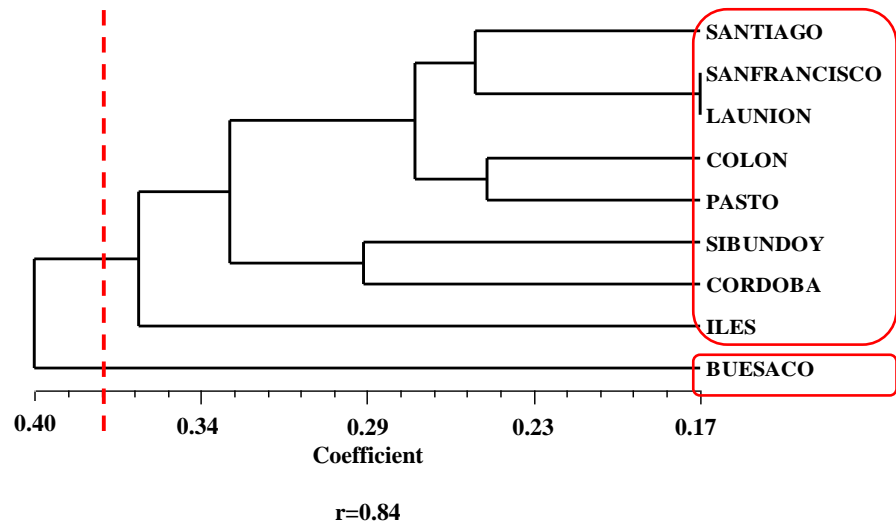


Figura 34. Fenograma de agrupamiento de la mezcla de aislamientos de *Colletotrichum acutatum* inoculadas en los frutos pintones.

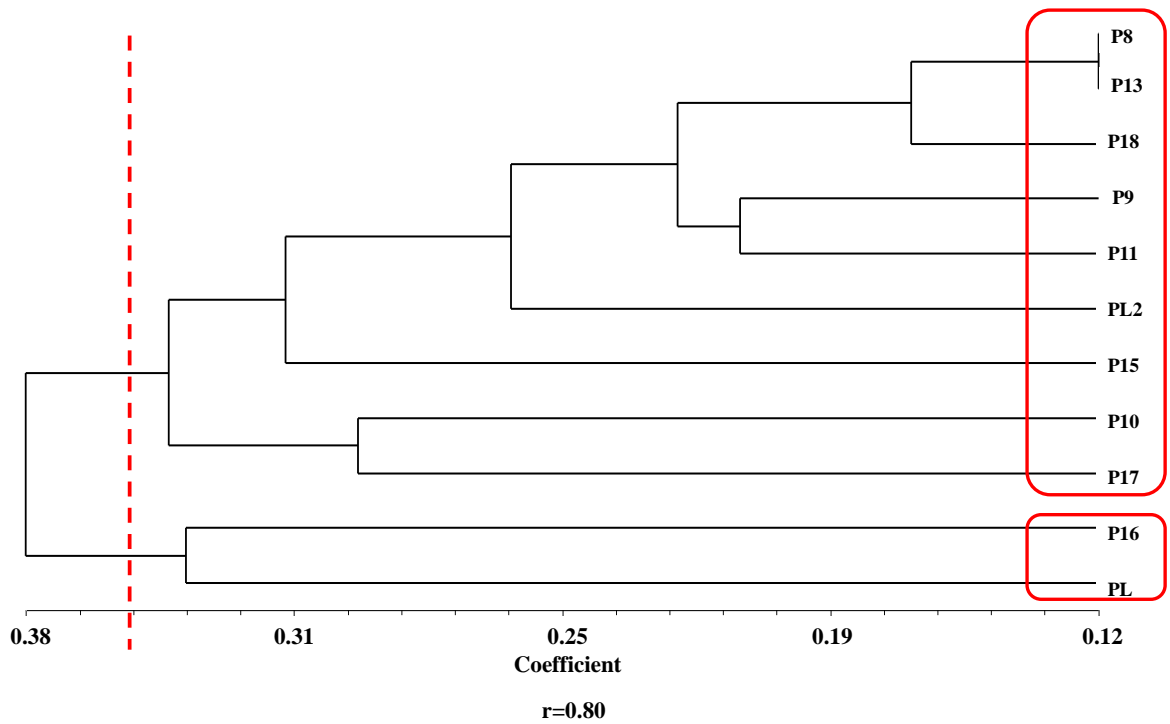


Figura 35. Fenograma de agrupamiento de los genotipos pintones inoculados con *Colletotrichum acutatum*.

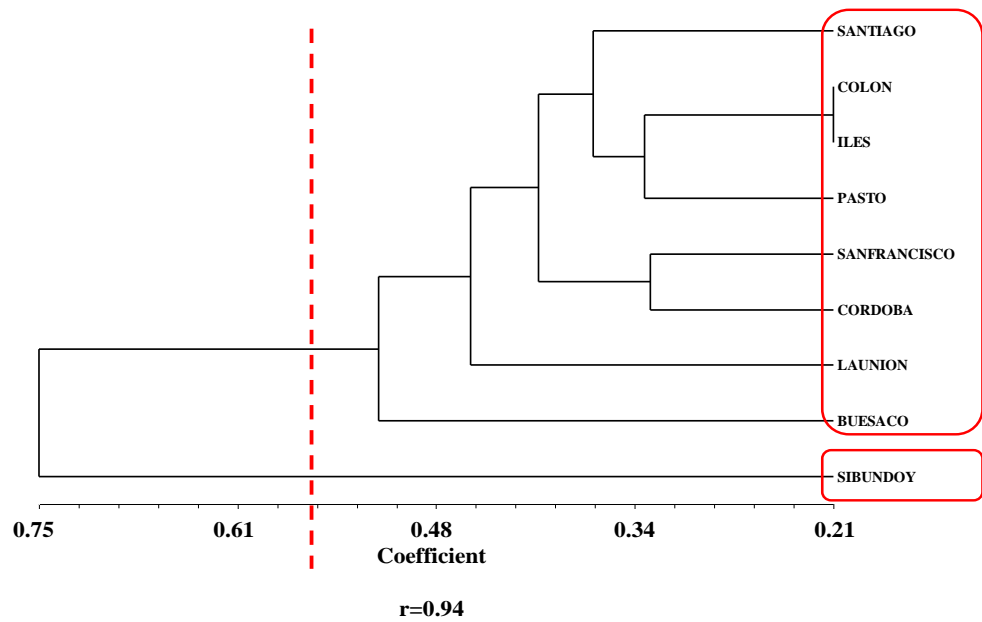


Figura 36. Fenograma de agrupamiento de la mezcla de aislamientos de *Colletotrichum acutatum* inoculadas en los frutos verdes.

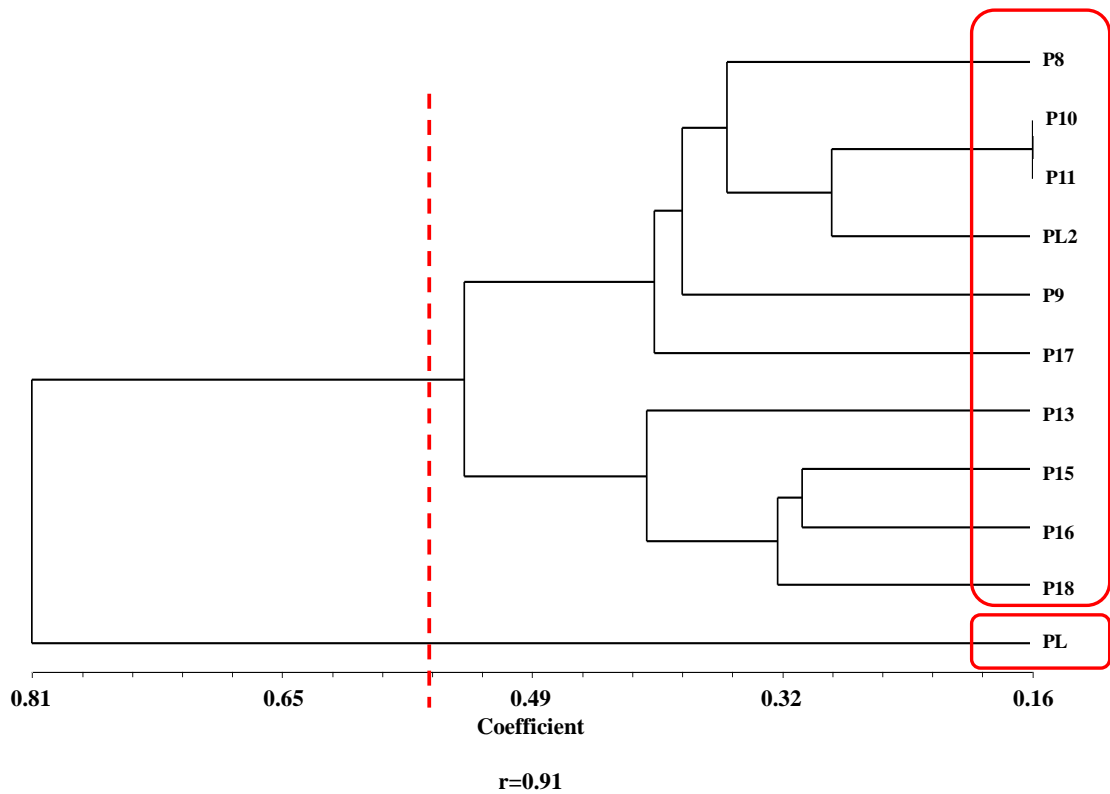


Figura 37. Fenograma de agrupamiento de los genotipos verdes inoculados con *Colletotrichum acutatum*.

6. CONCLUSIONES

- ✓ El análisis de la región del espaciador interno transcrito ITS del ADN ribosomal permitió establecer que la especie de *Colletotrichum* que ataca los cultivos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt) en los departamentos de Nariño y Putumayo es *Colletotrichum acutatum*.
- ✓ Mediante el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) se estableció que *C. acutatum* es un patógeno altamente variable genotípicamente. El 95.77% de la diversidad genética se debe a la variación dentro de las dos poblaciones estudiadas en comparación y el 4.23% correspondiente a la variación entre las dos regiones de estudio (Nariño y Putumayo).
- ✓ No existe homogeneidad en los aislamientos de *Colletotrichum acutatum*, presentándose una gran variabilidad en su patogenicidad, debida a la plasticidad fenotípica y la capacidad de adaptación de este patógeno a diferentes condiciones.
- ✓ Mediante las pruebas de patogenicidad se estableció que los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mas agresivos, en los genotipos evaluados, son los provenientes del municipio de Santiago (Putumayo) y los menos agresivos los de Sibundoy (Putumayo) y Buesaco (Nariño).
- ✓ Los genotipos estudiados presentaron un comportamiento diferencial de reacción frente a las nueve mezclas de aislamientos evaluadas, destacándose los genotipos P16 y PL por presentar los valores más bajos en las variables evaluadas.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ Debido a la alta variabilidad genética que presenta *Colletotrichum acutatum* se recomienda ampliar este estudio utilizando marcadores moleculares codominantes que brinden mayor información.
- ✓ Se recomienda realizar pruebas de patogenicidad en especies silvestres de tomate de árbol con el fin de establecer si son resistentes a *Colletotrichum acutatum*.
- ✓ Realizar las pruebas de patogenicidad en campo para corroborar los datos obtenidos en este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Abang M., Hoffmann P, Winter S, Green KR, Wolf G. 2004. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. J. Phytopathol. (In press).
- Adaskaveg, J. & Hartin, R. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. En: Phytopathology. 87: 979-987.
- Afanador K., Dror L., Minz M. and Freeman S. 2003. Characterization of Colletotrichum Isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and Identification of a Unique Species from the Genus. Phytopathology. Vol. 93, No. 5.
- Alarcon J., Chavariaga W. 2007. Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (penz) penz & sacc. en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. Agron. 15(1): 89 – 102.
- Albornoz, G. 1992. El tomate de árbol en el Ecuador. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, Ec. 130 p.
- Álvarez E., Ospina C., Mejia J. y Llano G. 2005. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Centro internacional de agricultura tropical (CIAT), Cali, Colombia. Fitopatología Colombiana 28(1/2):1.
- Andra E., Uesugi C., Ueno B. & Ferreira M. 2007. Caracterização Morfofocultural e Molecular de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Patogênicos ao Mamoeiro. Fitopatol. Bras. 32(1).
- Arauz L. F. 1998. Fitopatología: Un Enfoque Agroecológico. San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Aranzazu F. y Rondón G. 1999. Manejo productivo del cultivo del tomate de árbol y de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), Penz. & Sacc.). Santafé de Bogotá: Boletín Divulgativo CORPOICA-PRONATTA. p. 9-18.
- Araya C. 2003. Coevolución de Interacciones Hospedante – Patógeno en Frijol Común. Fitopatol. bras. 28(3).
- Arenas A., Álvarez E., Gonzales A., Mejía J. 2007. Caracterización molecular y patogénica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados a la antracnosis de cultivos de mora del valle del cauca. Memorias XXVIII Congreso ASCOLFI, CIAT. Octubre 3, 4, 5.

- Bailey J. and Jeger M. 1992. *Colletotrichum*. Biology, pathology and control. Wallingford UK: CAB International. 387p.
- Bardakci F. 2000. Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD. Turk J Biol 25 (2001) 185-196.
- Becerra V. y Paredes M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura técnica 60(3): 270-281.
- Black W.C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. Insect Molecular Biology, v.2, p.1-6.
- Botero M. 2001. Interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., agente causal de la Antracnosis en tomate de árbol (*Cyphomandra betace* (Cav.) Sendt.). Manizales. 184p. Tesis de Magíster en Fitopatología. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Botero M. 1999. Estudios biológicos y epidemiológicos de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en tomate de árbol y desarrollo de alternativas para su manejo integrado en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. 65p.
- Brown, A.E.; Sreenivasaprasad, S. and Timmer, L. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime Anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. En: Phytopathology. 86: 523-527.
- Burbano C., Estrada A., Rodriguez V., Revelo E., Alvarez S., Burbano O., Gonzalez M., Betancourt C., Salazar C., Lagos L. 2011. Sensibilidad in vitro de aislamientos de *Colletotrichum* spp obtenidos de *Solanum betaceum* (Cav.) en los departamentos de Nariño y Putumayo a los fungicidas beanomil y tiabendazol. Colombia, Nacional Evento: XXX Congreso colombiano de Fitopatología y XVI Congreso latinoamericano de fitopatología. Fitopatología colombiana ISBN: 0120-0143 vol.: 35 págs.: 148.
- Burdon J. & Silk J. 1997. Sources and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. Phytopathology 87:664-669. 1997.
- Cadavid M., Kelemu S., Osorio J. 2007. Diversidad genética de *Colletotrichum* spp. como agente causal de la antracnosis en frutales en Colombia Memorias XXVIII Congreso ASCOLFI, CIAT. Octubre 3, 4, 5.
- Campos H.A. 1995. Marcadores moleculares. Conceptos. Notas técnicas. AGRO SUR 23: 63-75.

Carlile M.J., Watkinson S.C. 1996. Fungal cells and vegetative grown. In: Carlile, M.J.; Watkinson, S.C. The fungi. Academic Press, London, p.77-151.

Casarrubias U., González M., Cruz A., Cárdenas E., Nieto A. y Guevara R. 2003. Variabilidad genética del genero *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. Sacc. aislado de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. Revista Mexicana de Fitopatología, diciembre, año/vol. 21, numero 003. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Ciudad Obregón, México. Pp. 338-345.

Cerón L., Higuera B., Buitrago G. 2006. Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* durante su cultivo en medios líquidos. Acta Biológica Colombiana, Vol. 11 No. 1, 99 – 109.

Collins R. A. and Saville B. J. 1990 Independent transfer of mitochondrial chromosomes and plasmids during unstable vegetative fusion in *Neurospora*. Nature 345: 177–179.

Contreras C. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum spp.* Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Magnifera indica* L) y tallos de mora (*Rubus glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. Tesis. Facultad de ciencias básicas. Pontificia Universidad Javeriana.

CORPOICA. 1999. Estudios biológicos y epidemiológicos de la Antracnosis del tomate de árbol y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia: Informe Técnico Final. PRONATTA-CORPOICA. Santafé de Bogotá, D.C. 147p.

CORPOICA. 1998. Programa nacional de manejo integrado de plagas- MIP. Documento de trabajo. Bogotá: Centro de Investigación Tibaitatá. 6p.

Delgado F. y Vásquez M. 2010, Control biológico de la Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. y Sacc.) en Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante hongos endófitos antagonistas. La Granja 11 (1). Pp. 36-43.

Denoyes-Rothan B., Guerin G., Lerceteau-Kohler E., Risser G. 2005. Inheritance of a race-specific resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria x ananassa*. Phytopathology 95 (4): 405–412.

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

Dodd J.C., Bugante I., Jeffries P., Jeger M. 1991. Pre and post harvest control of mango anthracnose in the Philippines. *Plant pathology* 40:576-583.

Duke University. Vilgalys Lab. En línea. Conserved cebadores sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. [http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/cebadores.htm#Internal%20transcribed%20pacer%20\(ITS\)%20region%20cebadores](http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/cebadores.htm#Internal%20transcribed%20pacer%20(ITS)%20region%20cebadores). Consulta: 20 enero, 2010.

Espinosa M. 2006. Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinérea*. Tesis de doctorado, departamento de bioquímica y biología molecular, microbiología, medicina preventiva y salud pública, fisiología y genética, universidad de Cádiz

Estrada A., Burbano C., Rodriguez V., Revelo E., Alvarez S., Burbano O., Gonzalez M., Betancourt C., Salazar C., Lagos L. Sensibilidad in vitro de aislamientos de *Colletotrichum* spp obtenidos de *Solanum betaceum* (Cav.) en los departamentos de Nariño y Putumayo al fungicida Antracol. Colombia, Nacional Evento: XXX Congreso colombiano de Fitopatología y XVI Congreso latinoamericano de fitopatología. *Fitopatología colombiana* ISBN: 0120-0143 vol.: 35 págs. 148.

Estrada A. y Lagos L. 2011. "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". En: Memorias XLV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. p.p 166. Armenia, Octubre. ISBN 0120-4173.

Excoffier L. and Lischer H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux andWindows. *Mol. Ecol. Res.*, 10, 564–567.

Forster H, Adaskaveg JE., 1999. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. *Phytopathology* 89:1056-1065.

Freeman S., Horowitz S., Sharon A. 2001. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology*, Vol. 19, No. 10.

Freeman S., Minz D., Jurkevitch E., Maymond M., Shabi E.. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*, Vol. , No. 6.

Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. En: Plant Disease. 82(6): 596-604.

Freeman, S & Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose and Root Necrosis of Strawberry in Israel. The American Phytopathological Society.

Freeman, S., T. Katan y E. Shabi. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. Applied and Environmental Microbiology. 62 (3): 1014- 1020.

Gaztambide I. 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.

GENPAT. Grupo de investigación Genética y Evolución de Organismos Tropicales, sexto informe de actividades del macroproyecto: Evaluación de la resistencia de poblaciones de *Solanum betaceum* y especies silvestres relacionadas contra poblaciones del patógeno *Colletotrichum* spp. Convocatoria Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2008, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural -Universidad de Nariño. Pasto, agosto 2011. CONVENIO N° 054/08 MADR/CIAT.

Guerber J. & Correll J. 2001. Characterization of *Glomerella acutata*, the Teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia*. Vol. 93, No. 1 (Jan. - Feb., 2001), pp. 216-229.

Glass N., Jacobson D. and Shiu P. 2000 The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu. Rev. Genet.* 34: 165–186.

Griffith G. & Shaw D. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes Are Detected after PCR Amplification of ADN from Pure Cultures or from Host Lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, October 1998, p. 4007-4014, Vol. 64, No. 10.

Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Nat* 44:223–270

Jelev Z., Bobev S., Minz D., Maymon M. and Freeman S. 2008. Characterization of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Bulgaria. *Phytopathology* 156, 668-677.

Johnston PR., Jones D., 1997 Relationships among *Colletotrichum* isolates form fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89:420-430.

Juarez H.S. 2002. Efecto del nitrógeno, edad de planta y edad de hoja en el tizón tardío de la papa. Tesis de Magíster Scientiae en Fitopatología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. p.100.

Katan, T. 2000. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: Prusky, D., Freeman, S. & M.B. Dickman (eds.), *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*, pp. 145-179. The American Phytopathological Society, St. Paul MN.

Kelemu S., Skinner D., Badel J., Moreno C., Rodríguez M., Fernandez C., Charcar M., and Chakraborty S. 1999. Genetic diversity in South American *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. *European Journal of Plant Pathology*. 105: 261-272.

Kosman E. & Leonard KJ. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology* 14:415-424.

Landry P. A. & Lapointe F. J. 1996. RAPD problems in phylogenetics. *Zoologica Scripta*, 25: 283-290.

Lardner P. R., Johnston K. M., Plummer & Pearson M. N. 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. *Mycol. Res.* 103 (3) : 275 -285.

Leandro L.F.S., Gleason M.L., Nutter F.W. Jr. 2001. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology* 91:659-664.

Lobo, M. 2002. 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.

Luna F., Flores A. & Ponce P. 2003. Caracterización molecular de aislados de *Sclerotium cepivorum* mediante análisis del polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar. *Elementos* 49, pp . 53 – 59.

MADR. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Apuesta Exportadora Agropecuaria 2006-2020.

MAG/IICA. Ministerio de Agricultura y Ganadería - República del Ecuador. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Subprograma de Cooperación Técnica (Préstamos BID / MAG 831/OC y 832/OC - EC). Identificación de mercados y tecnología para productos agrícolas tradicionales de exportación. 2001. Disponible en: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/principal.htm>

- McDonald, B.A., Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40, 349-379.
- Mahuku G. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial ADN. *Plant Mol. Biol. Rep* 22:71-81.
- Manzo G. 2001. Diversidad genética de *Mycosphaerella fijiensis* Morolet en plátano enano gigante (*Musa acuminata* AAA) cultivado con diferente manejo. Tesis. Facultad de ciencias biológicas y agropecuarias. Universidad de Colima, México.
- Martín M. P., García Figueres F., Trapero A. 2002. Iniciadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos. *Bol. San. Veg. Plagas*, 28: 43-50.
- Martínez E., Hío J., Osorio J., Torres M. 2009. Identificación de las especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en lima Tahití, tomate de árbol y mango. *Agronomía colombiana* 27(2), 211-218.
- Marulanda M., Isaza L., Ramirez A. 2007. Identificación de la especie de *Colletotrichum* responsable de la antracnosis en la mora de castilla en la región cafetera. *Scientia et technica* año XIII, No. 37.
- Mendgen K, Hahn M. 2000. Plant Infection and the Establishment of Fungal Biotrophy. *Trends Plant Sci* 1-4.
- Meyer A., Dalirsefat S. & Ziyaeddin M. 2009. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with amplified fragment length polymorphism markers in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Science*: Vol. 9, Article 7.
- Milgroom MG. 1996. Recombination and the multiloci structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology*;34(1):457-477
- Mills P.R., Sreenivasaprasad S. y Brown A.E. 1994: Detection of the anthracnose pathogen *Colletotrichum*. In *Modern Assay for Plant Pathogenic Fungi: Identification, detection and quantification*. Schots A, Dewey FM, Oliver R (eds.). CAB International.
- Narayanasamy P. 2008. *Molecular biology in plant pathogenesis and disease management*. Volume 1. Editorial Springer Science Business Media.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). En línea. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consulta: 20 enero, 2010.

Norma técnica Colombiana para tomate de árbol NTC 4105.1997.

Orozco M. 2006. Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de *Colletotrichum acutatum* Simmonds de cítricos en México. Tesis para optar por el título de doctor en biotecnología microbiana. Universidad de Colima, México.

Orozco M., Manzo G., Guzmán S., Larios J., Timmer W. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. Revista Mexicana de fitopatología. Volumen 22, Número 3.

Ordoñez M., Hohl H., Velasco J., Ramon M P., Oyarzun P., Smart C., Fry W., Forbes G., and Erselius L. 2000. A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans* attacks wild *Solanum* species in Ecuador. Phytopathology. Vol. 90, p. 197 - 202.

Parra L. 2008. Relación entre infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango (*Mangifera indica* L) variedad hilacha. Tesis. Facultad de ciencias básicas. Pontificia Universidad Javeriana.

Padrón, J. 1991. Elementos de Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación Ciudad de la Habana. p. 58-59.

Peres N. A., Timmer L. W., Adaskaveg J. E., Correll J. C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease. Vol. 89 No. 8.

Plumbley R., Prusky D., Kobiler I. 1993. The effect of hot-water treatment on the levels of antifungal diene and quiescence of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits. Plant pathology 42, 116-120.

Rivera G. 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología.

Roca MG and Wheals A.E. 2005. Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. FEMS Microbiol. Lett. 249:191-198.

Roca MG, Davide LC, Davide LM, Mendez-Costa M.C., Shwan RF and Wheals A.E. 2004. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. Mycol Res.108:1320-1326.

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

Rodríguez R., Ramirez T., Simpson J. 2004. Capacidad de anastomosis de cepas del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn) Scrib. Agente causal de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 22, número 001.

Rojas A., Álvarez E., Castaño J. 2007. Caracterización patogénica, molecular y sensibilidad a biofungicidas de *Colletotrichum* spp., agente causante de la antracnosis del guanábano *Annona muricata* L.). Memorias XXVIII Congreso ASCOLFI, CIAT. Octubre 3, 4, 5.

Rondón J. 2003. Estudio biológico y epidemiológico de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, penz), del tomate de árbol (*Solanum betaceae*, (cav) sendt), y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia.

Saldarriaga, A.; Castaño, J.; Arango R. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. Rev. Acad. Colomb. Cienc.: Volumen XXXII, Número 123.

Saldarriaga, A; Bernal, J. & Tamayo, P. 1997. "Enfermedades del cultivo del tomate de árbol en Antioquia: guía de reconocimiento y control". En: *Boletín técnico*. 43 p.

Saldarriaga, A. 2006. Caracterización del agente causante de la Antracnosis en tomate de árbol, manzana y mora. Manizales. 191p. Tesis de Magíster en Fitopatología. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Sanabria, A. 2007. Caracterización de la diversidad genética de *Colletotrichum* spp. como agente causante de Antracnosis en limón, tomate de árbol y mango. M.Sc. tesis. Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Shih J, Wei Y, Goodwin PH. 2000. A Comparison of the Pectate lyase Genes *Pel-1* and *Pel-2* of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* and the Relationship Between Their Expression on Culture and During Necrotrophic Infection. Gene. 243:139-150.

Sreenivasaprasad, S. and Talhinhos, P. 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. Molecular Plant Pathology 6: 361-378.

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

Sutton B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum - biology, epidemiology and control* (Ed. by Bailey, J.; Jeger, M.), pp. 1-26. CAB International, Wallingford, UK.

Talhinhas P., Sreenivasaprasad S., Neves-Martins J. and Oliveira H. 2002. Genetic and Morphological Characterization of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose of Lupins. *Phytopathology*, Vol. 92, No. 9.

Tapia R., Quijano A., Cortes A., Lappe P., Larque A., Perez D. 2008. PCR-Based Detection and Characterization of the Fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* Causing Anthracnose in Papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Mol Biotechnol* 40:293–298.

Tamayo P. 2001. Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulo en Colombia. Boletín Técnico 12. Rionegro (Antioquia): Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). p. 21-23.

Tamayo, P.J. 1990. Mosaico del tomate de árbol. *ASCOLFI Informa*.16 (6), 54-55

Tenover F., Arbeit R., Goering R., Mickelsen, Murray B., Persing D. and Swaminathan B. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of clinical microbiology*, Sept, p. 2233–2239.

Tenover F., Arbeit R., Goering R., Mickelsen. 1997. How to select and interpret molecular stain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologist. *Infection control and hospital*, Vol. 18 No. 6.

Vanderplank J. 1984. Disease resistance in plants. Orlando: Academic.

Velasco R. 2004. Principio de las Técnicas Moleculares Basadas en PCR. Trabajo de Grado Especialista en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Volcy Ch. 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, vol. 26, núm. 1, pp. 107-115

Walker, J. M. & Rapley, R. 2008. *Molecular Biomethods Handbook*. Second edition. Editorial Humana Press. Pág. 141-146.

Williams G.K., Kubelik A., Livak K., Rafalski J. & Tingey S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22 6531.

Wharton, P. and Dieguez, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anuales del Jardín Botánico de Madrid* 61(1): 3-22.

Wharton, P.S. & Schilder, A.C. 2008. Novel Infection Strategies of *Colletotrichum acutatum* on Ripe Blueberry Fruit. *Plant Pathology*, Vol.57, (May 2007), pp. 122–134.

White, T. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Academic press, San Diego, C.A* p 315-322.

Wyand R. and Brown J. 2003. Genetic and forma specialis diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution. *Molecular plant pathology* 4:187-198.

ANEXOS

ANEXO 1. DATOS DE PASAPORTE DE LOS AISLAMIENTOS PROVENIENTES DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

Cód. muestra	Fecha de colecta	Donante	Municipio	Corregimiento	Vereda	GN	MN	SN	GO	MO	SO	Altura	Cultivar	Parte de la planta de la cual proviene el aislamiento		
														Fruto	Tallo	Hoja
N8011	septiembre 18 de 2008	Magdalena Meneses	Pasto	Mapachico		1	14	10.9	77	19	50.4	2737	común			X
N8012	septiembre 18 de 2008	Blanca Alicia Botina	Pasto	Mapachico		1	14	13.1	77	19	46.8	2733	común	X		
N8017	septiembre 18 de 2008	Benjamín Sañudo	Pasto	Mapachico		1	14	08.8	77	18	56.7	2722	común	X		
N9047	enero 22 de 2009	María Sara Paz	Buesaco		Medina Orejuela	1	18	38.8	77	8	43.8	2322	NS			X
N9048	enero 22 de 2009	María Sara Paz	Buesaco		Medina Orejuela	1	18	38.8	77	8	43.8	2322	NS	X		
N9052	enero 22 de 2009	Luis Alberto Loaisa	Buesaco		Medina Orejuela	1	18	52.4	77	8	31.3	2173	NS			X
N9057	enero 22 de 2009	Segundo Loaisa	Buesaco		Medina Orejuela	1	19	07.1	77	8	30.7	2144	NS	X		
N9067	enero 22 de 2009	Francisco Gómez	Buesaco		Llano Largo	1	20	27.7	77	10	49	2306	NR	X		
N9080	febrero 2 de 2009	Liliana Gualguan	Buesaco	Rosal del Monte		1	17	39.3	77	10	42.4	2508	NS	X		
N9083	febrero 2 de 2009	Ortensia Torres	Buesaco	Rosal del Monte		1	17	38.5	77	10	43.2	2560	común			X
N9088	febrero 2 de 2009	Elvia Julia Velásquez	Buesaco	San Miguel Bajo		1	16	59.9	77	10	30.9	2602	rojo			X
N9096	febrero 18 de 2009	Wilson Quenguan	Iles	San Juan		0	53	26.7	77	33	4.8	2439	común	X		
N9097	febrero 18 de 2009	Wilson Quenguan	Iles	San Juan		0	53	26.7	77	33	4.8	2439	varón	X		
N9098	febrero 18 de 2009	Pastora Emilia Maya	Iles	San Juan		0	53	58.4	77	32	59.2	2437	común	X		
N9256	junio 30 de 2009	Jorge Enrique Armero	La Unión		El Sauce B	1	36	57.1	77	5	41.3	1557	amarillo			X
N9261	junio 30 de 2009	Jorge Enrique Armero	La Unión		El Sauce B	1	37	0	77	5	31.9	1607	amarillo	X		
N9271	junio 30 de 2009	Audelo Arcos	La Unión		Chical Alto	1	35	34.3	77	5	26.7	NR	N.S			X
N9276	agosto 12 de 2009	María Esperanza Gualpa	Córdoba			0	52	56.1	77	33	18.5	2488	amarillo	X		
N9278	agosto 12 de 2009	Fabio Castro	Córdoba			0	52	57.6	77	33	18.1	2484	varón	X		
N9281	agosto 12 de 2009	Gerardo Cuarán	Córdoba			0	52	53.2	77	33	21.9	2492	manzano			X
N9285	agosto 12 de 2009	Carmen Rosero	Córdoba			0	52	45.6	77	33	23.1	2500	manzano	X		
N9286	agosto 12 de 2009	Carmen Rosero	Córdoba			0	52	19.5	77	33	29.5	2561	manzano			X
N9292	agosto 12 de 2009	Germán Etuyan	Córdoba			0	52	11.3	77	33	29.7	2538	pata de perro	X		
N9293	agosto 12 de 2009	Leonardo Perenguez	Córdoba			0	52	6.8	77	33	27.7	2553	pata de perro	X		
N9295	agosto 12 de 2009	Mariana Rosero	Córdoba			0	52	1	77	33	27	2554	pata de perro	X		

* GN, MN, SN: Grados, minutos, segundos latitud norte; GO, MO, SO: Grados, minutos, segundos longitud oeste

*NS: no sabe, NR: no registra

ANEXO 2. DATOS DE PASAPORTE DE LOS AISLAMIENTOS PROVENIENTES DEL DEPARTAMENTO DE PUTUMAYO

Cód. muestra	Fecha de colecta	Donante	Municipio	Vereda	Barrio	GN	MN	SN	GO	MO	SO	Altura	Cultivar	Parte de la planta de la cual proviene el aislamiento		
														Fruto	Tallo	Hoja
P8003	Septiembre 8 de 2008	Ever Noguera	Santiago	Muchivioy		1	7	19.6	77	0	36.8	2349	Holandes	X		
P8004	Septiembre 8 de 2008	Ever Noguera	Santiago	Muchivioy		1	7	32.5	77	4	30.1	2310	Hibrido			X
P8013	Septiembre 13 de 2008	Rosa Cuatindioy	Santiago	La Y		1	10	35.4	76	59	41.9	2116	Común	X		
P8020	Septiembre 14 de 2008	Andrés Goyes	Colón		Las Américas	1	11	0.94	76	58	35.4	2107	Amarillo	X		
P8022	Septiembre 14 de 2008	Inés Martínez	Colón		Centro	1	11	0.98	76	58	22.5	2093	Amarillo	X		
P8023	Septiembre 14 de 2008	Salvador Chasoy	Colón		Avenida los Termales	1	11	0.6	76	58	22.8	2094	Injerto	X		
P8024	Septiembre 14 de 2008	Salvador Chasoy	Colón		Avenida los Termales	1	11	0.6	76	58	22.8	2094	Injerto	X		
P8025	Septiembre 14 de 2008	Salvador Chasoy	Colón		Avenida los Termales	1	11	0.6	76	58	22.8	2094	Injerto	X		
P8026	Septiembre 13 de 2008	NR	Santiago	San Andrés		1	7	11.2	76	59	46.8	2011	Amarillo	X		
P8047	Octubre 4 de 2008	Clemencia Jacanamejoy	Santiago	Vichoy		1	10	39.1	76	10	39.1	2149	Común			X
P8050	Octubre 4 de 2008	Clemencia Jacanamejoy	Santiago	Vichoy		1	10	39.1	76	59	23.3	2149	Hibrido	X		
P8063	Octubre 5 de 2008	Margarita Jacanamejoy	Santiago	Vichoy									Común		X	
P8070	Octubre 11 de 2008	Rodrigo Ceballos	Colón		San Pedro/Las Lajas	1	13	12.0	76	56	34.4	2220	Hibrido/común			X
P8072	Octubre 11 de 2008	Rodrigo Ceballos	Colón		San Pedro/Las Lajas	1	13	12.0	76	56	34.4	2220	Hibrido			X
P8074	Octubre 11 de 2008	Luis Bernardo Ceballos	Colón		San Pedro/Las Lajas	1	13	00.3	76	56	28.5	2167	Común	X		
P8076		Manuel Gaviria	Colón		San Pedro/Buenos Aires	1	12	53.1	76	56	34.3	2148		X		
P8077	Octubre 13 de 2008	Estela Castro	Santiago	El Diviso		1	9	18.7	76	59	43.5	2087	Holandes	X		
P8078	Octubre 13 de 2008	Elkin Herney Gustin	Colón		La Josefina	1	10	16.9	76	58	53.9	2090		X		
P8082	Octubre 11 de 2008	Jaime Timaná	Colón		Las Palmas	1	11	58.0	76	57	32.6	2107	Común	X		
P8083	Octubre 11 de 2008	Rosa Quinchoa	Colón		Las Palmas	1	12	54.0	76	57	34.7	2110				X
P8086	Octubre 24 de 2008	Elkin Justín	Santiago	Vichoy		1	10	46.1	76	58	53.3	2085	Hibrido			
P8088		Berenice Rocero	Santiago	Tamauca Vieja		1	8	27.2	76	58	43.1	2105		X		
P8094	Octubre 4 de 2008	Roberto Arciniegas	Santiago	Quinchuapamba		1	8	57.5	76	59	45.2	2088	Hibrido		X	
P8096	Octubre 4 de 2008	Gloria Cuatindioy	Santiago			1	7	27.0	76	58	53.8	2091			X	
P8097	Octubre 4 de 2008	Milton Zamudio	Santiago			1	6	32.2	76	58	58.9	1983	Holandes	X		
P8098	Noviembre 7 de 2008	Manuel Carlosama Olaya	San Francisco		Casco Urbano	1	10	16.1	76	52	41.6	2148				X
P8109	Noviembre 7 de 2008	Edgar Meneses	San Francisco	Chinayaco		1	9	31.9	76	54	03.8	2115	Injerto	X		
P9111	Noviembre 12 de 2008	NR	Sibundoy			1	9	52.6	76	59	41.5		Amarillo	X		

P9112	Noviembre 12 de 2008	NR	Sibundoy			1	9	52.6	76	59	41.5			Rojo			X
P9115	Enero 17 de 2009		San Francisco													X	
P9117	Enero 17 de 2009	Victor Burbano	San Francisco		Barrio Botero	1	10	28.9	76	52	57.1	2185	Común	X			
P9118	Enero 17 de 2009	Victor Burbano	San Francisco		Barrio Botero	1	10	28.9	76	52	57.1	2185	Común		X		
P9127	Enero 17 de 2009	Justo Miticanoy	San Francisco	La Menta		1	9	8.7	76	57	33.3	2087	NR				X
P9133	Enero 17 de 2009	Ovidio Zamora	San Francisco	San Silvestre		1	10	16.7	76	56	10.8	2094	Holandes	X			
P9137	Enero 17 de 2009	Marcelino Jamioy	San Francisco	La Menta		1	9	24.0	76	56	25.2	2084	Holandes	x			
P9146	Enero 23 de 2009	José Jajoy	Sibundoy	Las Cochás		1	10	29.5	76	56	6.6	2086	Común	X			
P9148	Enero 22 de 2009	Victoriano Yela	San Francisco	Central San Antonio										Hibrido	X		
P9150	Enero 22 de 2009	Pastora Jamioy	San Francisco	San Silvestre		1	9	38.2	76	56	16.3	2095	NR				X
P9151	Enero 22 de 2009	Jaime Luna	San Francisco	Central San Antonio		1	9	27	76	55	44.7	2089	Hibrido	X			
P9160	Enero 22 de 2009	Johana Pejendino	San Francisco	San José del Chunga		1	8	12.1	76	56	19.8			Injerto	X		
P9168	Enero 22 de 2009	Ignacio Rosero	San Francisco	Central San Antonio		1	8	51.9	76	55	15.7	2110	NR				X
P9171	Febrero 5 de 2009	NR	Sibundoy	San Félix		1	10	49.11	76	55	41.3	2107	Común	X			
P9172	Febrero 5 de 2009	Pastora Juagibioy	Sibundoy	San Félix		1	10	37.6	76	54	51.8	2105	Hibrido	X			
P9175	Febrero 5 de 2009	Juan Luna García	Sibundoy		Sagrado	1	11	4.7	76	55	26.8	2091	Holandes	X			
P9179	Febrero 6 de 2009	NR	Sibundoy	Bella Vista		1	12	45.9	76	55	31.2	2151	Común				X
P9184	Febrero 6 de 2009	Pepe Yela	Sibundoy		Villa Fátima	1	12	0.5	76	54	45.4	2125	Injerto	X			
P9185	Febrero 5 de 2009	Gonzalo Taimbo	Sibundoy	Cabuyayaco		1	11	17.3	76	56	11	2096	Común	X			
P9187	Febrero 6 de 2009	Paula Angulo	Sibundoy		Fátima	1	11	58.3	76	54	38.1	2142	Común	X			
P9190	Febrero 6 de 2009	Zoila Botina	Sibundoy	Villa Flor		1	12	43.8	76	55	8.4	2218	Común	X			
P9192	Febrero 5 de 2009	Miriam Insuasty	Sibundoy	San Félix		1	11	22.4	76	55	42.8	2100	Injerto	X			

* GN, MN, SN: Grados, minutos, segundos latitud norte; GO, MO, SO: Grados, minutos, segundos longitud oeste

*NS: no sabe, NR: no registra

ANEXO 3. DATOS GENOTIPOS DE TOMATE DE ÁRBOL SELECCIONADOS PARA PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

GENOTIPO	PROPIETARIO	VEREDA	COORDENADAS	ALTURA (m)	PRECISIÓN (m)
P8	AURA RAMOS		01°08'22.5" 77°00'0.9"	2121	6
P9	JESÚS VELAZQUES	Fuisanoy	01°07'28.1" 77°1'52.1"	2289	11
P16	JESÚS VELAZQUES	Muchivioy	01°08'16.1" 77°00'55.8"	2231	5
P15	JESÚS VELAZQUES	Muchivioy	01°08'13.9" 77°00'43.3"	2197	5
P10	SEGUNDO CUARAN	Fuisanoy	01°07'36.0" 77°01'44.9"	2286	4
P11	HUGO CHAGUEZA	Cascajo	01°07'45.4" 77°01'19.4"	2253	11
P17 P13	DASIER REVELO	Las Cruces	01°08'33.1" 77°00'16.4"	2123	6
P18	WILSON BUENO	B/Triunfo			
PL PL2	CARLOS HERNAN JOJOA		01°12'46.1" 77°12'48"	2810	5