

VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE *Colletotrichum acutatum* PROCEDENTES DE
CULTIVOS DE *Solanum betaceum* MEDIANTE EL MARCADOR MOLECULAR RAPD

ELIZABETH PORTILLA BARCO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
SAN JUAN DE PASTO
2012

VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE *Colletotrichum acutatum* PROCEDENTES DE
CULTIVOS DE *Solanum betaceum* MEDIANTE EL MARCADOR MOLECULAR RAPD

ELIZABETH PORTILLA BARCO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

DIRECTORA
LUZ ESTELA LAGOS MORA
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
SAN JUAN DE PASTO
2012

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:

Firma del Presidente de tesis

Firma del jurado

Firma del jurado

San Juan de Pasto, Febrero de 2012

RESUMEN

25 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* colectados por el grupo GENPAT en los años 2008 – 2009 a partir de huertas caseras y cultivos de tomate de árbol, en las áreas rural y urbana de cinco municipios del departamento de Nariño (nueve cepas) y cuatro municipios del departamento del Putumayo (15 cepas) fueron evaluados en este estudio. La variabilidad genotípica de los aislamientos fue evaluada mediante RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) empleando seis combinaciones de pares de primers de secuencias al azar que se escogieron por su alto contenido de información polimórfica. El dendrograma obtenido por el método UPGMA usando el índice de Jaccard (1908) muestra que la población de Nariño presenta un alto porcentaje de polimorfismo (56.3) al igual que Putumayo (79.3), evidencia de una elevada variabilidad dentro de las poblaciones. En general, los resultados obtenidos para ambas poblaciones evidencian un elevado porcentaje de polimorfismo (83.3), demostrando una estructura no clonal. Los conglomerados resultantes muestran un bajo grado de homogeneidad interna y un alto grado de heterogeneidad externa para los aislamientos de *C. acutatum*, lo que sugiere una alta variabilidad genotípica dentro de la población; se encontraron ciertas asociaciones de acuerdo al lugar de procedencia, sin embargo este carácter solo se presentó en algunos aislamientos. El análisis de diversidad genética a partir de los datos moleculares generados muestran que *C. acutatum* es un patógeno altamente variable genotípicamente, mediante una AMOVA se determinó que el 91,1% de la diversidad genética se debe a la variación dentro de las dos poblaciones estudiadas en comparación con el 8,9% de variación entre ambas regiones de estudio (Nariño y Putumayo). No se observó una diferencia genética significativa entre las dos regiones con un $F_{TS} = 0,08862$ indicando que ambas son similares.

ABSTRACT

25 isolates of *Colletotrichum acutatum* GENPAT collected by the group in the years 2008 to 2009 from home gardens and tree tomato crops in rural and urban areas of five municipalities in the department of Nariño (nine strains) and four municipalities in the department Putumayo (15 strains) were evaluated in this study. The genotypic variability of isolates was evaluated by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) using six combinations of pairs of primers of random sequences that were chosen for their high polymorphic information content. The dendrogram obtained by UPGMA method using the Jaccard index (1908) shows that the population of Nariño has a high percentage of polymorphism (56.3) as Putumayo (79.3), evidence of high variability within populations. Overall, the results obtained for both poblacionesevidencian a high percentage of polymorphism (83.3), showing no clonal structure. The resulting clusters show a low degree of internal homogeneity and high external heterogeneity of isolates of *C. acutatum*, suggesting a high genotypic variability within the population is encontraron ciertas asociaciones according to a source, but this character only appeared in some isolates. Analysis of genetic diversity from molecular data generated show that *C. acutatum* is a highly variable pathogen genotypically, by AMOVA was determined that 91.1% of genetic diversity due to variation within the two populations compared with 8.9% variation between the two study regions (Nariño and Putumayo). There was no significant genetic difference between the two regions with FTS = 0.08862 indicating that both are similar.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	15
2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	18
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 OBJETIVO GENERAL	20
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
6. HIPÓTESIS CIENTÍFICA DE TRABAJO	21
7. MARCO TEÓRICO	22
7.1 ANTECEDENTES	22
7.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Colletotrichum</i> spp.	24
7.3 BIOLOGÍA DE <i>Colletotrichum acutatum</i> J.H. Simmonds (1965).....	25
7.3.1 Características de <i>Colletotrichum acutatum</i>	26
7.3.2 Reproducción y genética	27
7.3.3 Mecanismos de variabilidad en hongos	28
7.3.3.1 Mutación	28
7.3.3.2 Herencia citoplasmática	29
7.3.3.3 Recombinación	29
a. Heterocariosis.....	30
b. Parasexualismo.....	31
7.3.3.4 Heteroploidia.....	32
7.3.3.5 Flujo genético	32
7.4 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE <i>Colletotrichum acutatum</i>	33
7.4.1 Polimorfismo del DNA Amplificado al Azar (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) ...	34
7.4.1.1 Principio de la técnica RAPD.....	34
8. MATERIALES Y MÉTODOS	36
8.1 ÁREA DE ESTUDIO	36

8.2SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS	37
8.3 OBTENCIÓN DE DNA A PARTIR DE MICELIO	39
8.3.1 Siembra de aislamientos.....	39
8.3.2Extracción de DNA.....	39
8.3.2.1 Protocolo de extracción directo Griffith Gareth y Shaw David, 1998	39
8.4 CARACTERIZACIÓN CON MARCADORES RAPD	40
8.4.1 Protocolo Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) reportado por Williams y colaboradores (1990) modificado por Lardner y colaboradores (1999)	40
8.5ANÁLISIS DE DATOS	43
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
9.1EXTRACCIÓN DE DNA Y ANÁLISIS RAPDs DE <i>Colletotrichum acutatum</i>	45
9.1.1Distancia genética para los aislamientos de <i>C. acutatum</i> procedentes de Nariño	57
9.1.2 Distancia genética para los aislamientos de <i>C. acutatum</i> procedentes de Putumayo	63
9.1.3 Distancia genética para los aislamientos de <i>C. acutatum</i> procedentes de Nariño y Putumayo	67
CONCLUSIONES	72
RECOMENDACIONES	73
ANEXOS.....	74
BIBLIOGRAFIA.....	78

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> obtenidos de cultivos de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) de los departamentos de Nariño y Putumayo.....	38
Tabla 2. Características de los oligonucleótidos (Operon Technologies, Inc.) utilizados para determinar la variabilidad genética de 25 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i>	41
Tabla 3. Combinaciones de pares de primers RAPDs utilizadas	41
Tabla 4. Reactivos, concentraciones y cantidades utilizadas para la amplificación de muestras de DNA mediante la técnica RAPDs	
Tabla 5. Número de loci generados con cada combinación de par de primers mediante RAPDs	47
Tabla 6. Número de loci generados con las seis combinaciones analizadas en este estudio	48
Tabla 7. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de <i>Cc acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs con la combinación A (OPDO: .. frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$)	49
Tabla 8. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación B (OPD 02 / OPD 03), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$) ..	50
Tabla 9. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación H (OPAN 08 / OPAN 19), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$)	52
Tabla 10. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación J (OPAN 08 / OPD 01), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$)	53
Tabla 11. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación M (OPAN : 02), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porce polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$)	54
Tabla 12. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación Z (OPAN 19 / OPD	

03), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$)..... 55

Tabla 13. Porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$) para los 24 aislados de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando las diferentes combinaciones..... 57

Tabla 14. Resumen del análisis de la varianza molecular de dos poblaciones de *Colletotrichum acutatum* (Nariño y Putumayo) evaluadas mediante DNA Polimórfico amplificado al azar 69

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum acutatum</i> agente causal de la antracnosis. Fuente: Orozco & Timmer (2005).	26
Figura 2. Esquema ilustrativo del proceso que origina heterocariosis en hongos. Fuente: Rivera (2007)....	30
Figura 3. Esquema ilustrativo del proceso de parasexualismo en hongos. Fuente: Rivera (2007).	31
Figura 4. Localización de los departamentos de Nariño y Putumayo en Colombia, y de los diferentes municipios (amarillo) de donde proceden los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> . Fuentes: Aristide (2012), IGAC (2003).	37
Figura 5. DNA de los 25 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> y los controles, mediante el protocolo de extracción directo de Griffith y Shaw (1998) modificado. CA: Control alterno(<i>C. gloeosporioides</i>), C+: Control positivo para <i>C. acutatum</i>	45
Figura 6. DNA diluido de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> y controles. CA: Control alterno(<i>C. gloeosporioides</i>), C+: Control positivo para <i>C. acutatum</i>	45
Figura 7. DNA amplificado de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs utilizando los primers individuales A. OPD 01, B. OPD 02, C. OPD 03 (con los que se amplificó los 25 aislamientos de <i>C. acutatum</i>); para los primers D. OPAD-08, E. OPAD-02, F. OPAN-08, G. OPAN-19, H. OPAN-20 e I. OPBA-08 se utilizó cinco muestras de DNA y un control negativo de reacción.	46
Figura 8. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación A: primers OPD01 / OPD02; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. C+: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; C-: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C--: Control negativo de la reacción.	49
Figura 9. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación B: primers OPD02 - OPD03; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. C+: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; C-: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C--: Control negativo de la reacción..	51
Figura 10. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs, utilizando la combinación H: primers OPAN 08 / OPAN 19; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. C+: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; C-: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C--: Control negativo de la reacción.	52

Figura 11. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> medianteRAPDs, utilizando la combinación J: primers OPAN08 - OPD01; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp)marca Fermentas. C+: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; C-: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-- : Control negativo de la reacción	53
Figura 12. . Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> medianteRAPDs, utilizando la combinación M (OPAN19 / OPD02); MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp)marca Fermentas. C+: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; C-: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C-- : Control negativo de la reacción	54
Figura 13. Patrón de bandas obtenidas para los 24 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante RAPDs utilizando la combinación Z: OPAN 19 / OPD 03; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp)marca Fermentas. C+: Control positivo para <i>C. acutatum</i> ; C-: Control alterno (<i>C. gloeosporioides</i>); C--: Control negativo de la reacción	55
Figura 14. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño mediante RAPDsla combinación A: OPD01/OPD02. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.....	58
Figura 15. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño mediante RAPDs con cada la combinación B: OPD02/OPD03. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard	59
Figura 16. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño medianteRAPDskon la combinación H: OPAN08/OPAN19. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard	59
Figura 17. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño medianteRAPDskon la combinación J: OPAN08/OPD01. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.....	60
Figura 18. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño mediante RAPDskon la combinación M: OPAN19/OPD02. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.....	61
Figura 19. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño mediante RAPDskon la combinación Z: OPAN19/OPD03. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.....	61

Figura 20. Distribución de los nueve aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Nariño medianteRAPDs en función de sus patrones génicos. Dendrograma consenso construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard, con un valor $r= 0.95215$	62
Figura 21. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Putumayo medianteRAPDscon la combinación A: OPD01/OPD02. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.....	63
Figura 22. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Putumayo medianteRAPDscon la combinación B: OPD02/OPD03. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.....	64
Figura 23. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Putumayo medianteRAPDscon la combinación H: OPAN08/OPAN19.Dendrogramaconstruido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.....	64
Figura 24. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Putumayo mediante RAPDscon la combinación J: OPAN08/OPD01. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard	65
Figura 25. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Putumayo medianteRAPDscon la combinación M: OPAN19/OPD02. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.....	65
Figura 26. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Putumayo medianteRAPDsla combinación Z: OPAN19/OPD03. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.....	66
Figura 27. Distribución de los aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> de Putumayo. Dendrograma consenso obtenido utilizando 96 bandas mediante el uso de RAPDs, construido usando el método UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard, con un valor $r= 0.83995$	67
Figura 28. Distribución de los 24 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> procedentesde Nariño y Putumayo medianteDNA 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 $r= 0.83675$	68

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo A. Morfología y lugar de procedencia de los 25 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> evaluados.....	74
Anexo B. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante la amplificación aleatoria de DNA polimórfico, RAPDs, utilizando las diferentes combinaciones. MM: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (100-3000bp)	76

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la elevada gama de microorganismos que hacen parte de la diversidad presente en el planeta, se encuentra el grupo de los hongos, entre ellos *Colletotrichum* uno de los más grandes géneros de Coelomycetes dotados de una alta capacidad de adaptación, gracias a la amplia variabilidad morfológica, fisiológica y patogénica que le ha permitido adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a tener una amplia distribución geográfica (Negrete & Redondo, 1997; Oliveira *et al.*, 2005; Tozzeet *al.*, 2006; Saldarriaga *et al.*, 2008).

La sistemática del género *Colletotrichum* y su historia taxonómica han sido complejas, desde que fue descrito por Tode en 1790 ha llegado a implicar hasta 17 géneros sinónimos como *Vermicularia*, *Dicladium*, *Gloeosporium* y *Ellisiella* entre otros, hasta que *Colletotrichum* fue establecido como género por Corda en 1831 (Sutton, 1992). Se clasifica en el *Phylum* de forma *Deuteromycota* o también llamado *Deutoromycetes* (imperfectos o asexuales) una categoría no universalmente aceptada, pero de bastante peso en la taxonomía fúngica más actualizada (Montoya, 2008). En la literatura es frecuente encontrar dos nombres válidos para un mismo hongo, uno correspondiente a la fase anamórfica, imperfecta o asexual y el otro a la fase teleomórfica, sexual o perfecta (Rivera, 2007), como es el caso del género *Colletotrichum* (Anamórfo) descrito en la clase Coelomycetes y el género *Glomerella* (Teleomórfo) en la clase Ascomycetes (Wharton & Diéguez, 2004).

La identificación y diferenciación de las especies de *Colletotrichum* spp. se han basado en caracteres morfológicos, principalmente tamaño y forma de las conidias, presencia de setas, esclerocios, forma del apesorio, color y aspecto de la colonia, y otras características como tasa de crecimiento, sensibilidad a fungicidas, temperatura óptima de crecimiento, existencia del teleomórfo y especificidad sobre el hospedero (Bailey & Jeger, 1992; Adaskaveg & Hartin, 1997; Freeman, Katan & Shabi, 1998; Martínez-Culebras *et al.*, 2000). La morfología de las conidias se ha aplicado como medio fiable de discriminar a determinadas especies del género *Colletotrichum* (Than *et al.*, 2008); sin embargo, el problema con la taxonomía de *Colletotrichum* spp. reside en que produce conidias secundarias que generalmente son variables en tamaño y forma, dificultando la identificación (Bailey & Jeger, 1992). Algunos factores causantes de la variabilidad son la plasticidad e inestabilidad de los rasgos morfológicos, la existencia de formas intermedias en la misma, la superposición fenotípica, los efectos ambientales sobre los rasgos morfológicos, entre otros (Adaskaveg & Hartin, 1997) haciendo posible encontrar una gran cantidad de aislamientos morfológicamente diferentes pertenecientes a una sola especie (Freeman, Katan & Shabi, 1996).

Los principales mecanismos por los cuales se genera la variabilidad genética en las poblaciones de microorganismos fitopatógenos son las mutaciones (de cromosoma, por inserción o eliminación de fragmentos de DNA, o transposones), el flujo de genes en las poblaciones (local o a largas distancias) y la recombinación (sexual o asexual) (Burdon & Silk, 1997). La recombinación sexual es el mecanismo más eficiente para incorporar diversidad en poblaciones de organismos fitopatógenos, sin embargo, la recombinación también se puede obtener por medio de compatibilidad vegetativa, término que refiere a la capacidad de cada una de las cepas de hongos para someterse a una mutua anastomosis hifal, dando lugar a células viables que contienen los núcleos fusionados de ambas cepas en un citoplasma común (Katan, 2000), denominado Heterocariosis si la coexistencia es entre núcleos genéticamente diferentes, y Parasexualismo, cuando los núcleos de hifas o células heterocarióticas se fusionan originando estados diploides; frecuentemente este estado puede perpetuarse por división mitótica y rara vez ocurre meiosis espontánea dando como resultado recombinaciones de caracteres que dan origen a genotipos distintos a los precursores (Rivera, 2007).

En el género *Colletotrichum* se destacan dos especies: *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds y *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc., estas especies son morfológicamente muy similares, presentan coincidencias en el rango de hospederos y los aislamientos en cultivo exhiben una gran variabilidad; además, ambas han sido consideradas complejos de razas o especies acumulativas (Sutton, 1992; Freeman, Katan & Shabi, 1996, 1998; Adaskaveg & Hartin, 1997; Martín *et al.*, 2002; Saldarriaga *et al.*, 2008), dificultando su separación por métodos taxonómicos tradicionales basados en características como la morfología de los cultivos (Martín *et al.*, 2002). Sin embargo, la biología molecular ha provisto de nuevas herramientas a la sistemática, particularmente en la delimitación de especies y en la definición de las relaciones inter e intraespecíficas.

En la última década, varias técnicas se han desarrollado para la identificación y tipificación de organismos procariontes y eucariotes a nivel del DNA, que difieren en su gama de taxonomía, el poder discriminatorio, reproducibilidad, la interpretación y la normalización (Bardakci, 2001; Walker & Rapley, 2008). El uso de técnicas moleculares como los Polimorfismos en la Longitud de fragmentos de Restricción (RFLP's), DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD's), Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP's), β tubulina (Freeman, Katan & Shabi, 1996, 1998) y las regiones codificadoras del DNA ribosomal (ITS) se destacan para determinar la posible existencia de niveles aparentes de variabilidad genética en las poblaciones (Freeman, Katan & Shabi, 1998). Dentro de estas técnicas RAPDs se destaca como un método de PCR versátil, rápido y sensible que requiere poco DNA y no presupone conocimientos previos sobre la secuencia a analizar (Walker & Rapley, 2008). Esta técnica ha sido desarrollada para el mapeo genético, fingerprinting, y es ampliamente utilizada en el análisis de los polimorfismos inter e intraespecíficos de diferentes organismos; siendo considerada como una poderosa herramienta para discriminar las diferentes especies y subespecies para el análisis genético y filogenético de una amplia variedad de microorganismos, plantas y mamíferos (Wharton & Diéguez, 2004; Walker & Rapley, 2008).

Ante la dificultad para discriminar entre diferentes aislamientos pertenecientes a *Colletotrichum acutatum* y en un intento de aclarar las relaciones intraespecíficas, se realizó una caracterización genotípica de las poblaciones de *C. acutatum* asociadas a *Solanum betaceum* mediante el uso del marcador molecular RAPD's, lo que permitió establecer la variación intraespecífica de los aislamientos obtenidos de nueve municipios de los departamentos de Nariño y Putumayo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Colletotrichum acutatum potencialmente limitado en su capacidad de generar variación genotípica debido a su reproducción de tipo asexual (Chaozu *et al.*, 1998); sin embargo, mediante diferentes mecanismos de generación de variabilidad genética como los reordenamientos cromosómicos (Masel *et al.*, 1990), el desmembramiento de cromosomas más grandes, los procesos de división irregulares (Sicard *et al.*, 1997; O'Sullivan *et al.*, 1998) y compatibilidad vegetativa (Katan, 2000; Wharton & Diéguez, 2004) se originan genotipos distintos a los precursores, debido a la generación de cariotipos diferentes o por recombinación de caracteres (Rivera, 2007). Guerber y Correl (2001), 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, estos cruces dentro de diferentes grupos de aislamientos variaron de muy fértiles, débilmente fértiles o infértiles.

La variabilidad genética es una condición presente en los patosistemas silvestres preservándose e incrementándose en los agroecosistemas (Araya, 1993). 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, son factores que aumentan la fuerza de selección ejercida sobre las poblaciones de patógenos presentes en esos sistemas disturbados por el hombre, factores que favorecen la expresión de nuevos genes de virulencia y polimorfismos en la estructura de las poblaciones (Rivera, 2007). Estos factores son practicados comúnmente en zonas agrícolas de Colombia, especialmente en la Región Andina caracterizada por ser la zona más poblada del país y económicamente la más activa de toda la cordillera de los Andes, debido a que posee la mayoría de los recursos hídricos así como las tierras más productivas para la agricultura (Cadena, 2000); además posee una gran variedad de formaciones geográficas naturales y por ende una alta diversidad climática, en la cual es notorio un aumento en la proliferación de patógenos de plantas como *C. acutatum* (Saldarriaga *et al.*, 2008).

Saldarriaga y colaboradores (2008) quienes caracterizaron morfológica, patogénica y molecularmente 41 aislamientos de *Colletotrichum* spp. procedentes de frutales de la región Andina, reportaron alta variabilidad dentro y entre las características morfológicas de las cepas, patogénicamente los diámetros de las lesiones mostraron un amplio rango de variación, diferencias que no se pudieron atribuir separadamente al patógeno o al hospedero, pero sí a una interacción entre ambos; mediante la amplificación de regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del RNAr se estableció que los aislamientos correspondían a *C. acutatum* como patógeno de diferentes hospederos. Igualmente, el grupo de investigación Genética de Patosistemas, GENPAT

(Cuarto informe MADR, agosto 2010), estableció que aislamientos procedentes de *Solanum betaceum* (tomate de árbol) de los departamentos de Nariño y Putumayo exhiben gran variabilidad en las características morfológicas, especialmente el color, el aspecto y tipo del micelio, lo cual hace que estos caracteres no sean confiables para la diferenciación de los aislamientos de *Colletotrichum*. Por otra parte, mediante la amplificación de regiones ITS del RNAr con primers específicos, *CaInt2* (*C. acutatum*) y *CgInt* (*C. gloeosporioides*), se determinó que los aislamientos corresponden a *C. acutatum*.

Teniendo en cuenta la alta variabilidad morfológica dentro de las poblaciones de *C. acutatum* y el incremento en la demanda de alternativas para el manejo de este patógeno de plantas, tendiente a la caracterización de esta especie con mayor precisión en términos genéticos y a esclarecer las relaciones entre las poblaciones de este fitopatógeno, fue preciso adelantar una caracterización genotípica de las poblaciones de *C. acutatum* procedentes de *Solanum betaceum* de los departamentos de Nariño y Putumayo mediante el uso de marcadores moleculares RAPDs.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la variabilidad genotípica de las poblaciones de *Colletotrichum acutatum* aisladas de cultivos de *Solanum betaceum* de los departamentos de Nariño y Putumayo?

4. JUSTIFICACIÓN

Colletotrichum spp. es uno de los géneros de hongos patógenos de plantas más importante y de mayor distribución en el mundo, debido a que, infecta especialmente cultivos de regiones tropicales, subtropicales (Manners *et al.*, 2000; Waller & Brigde, 2000) y templadas (Bailey & Jeger, 1992). Algunas especies de *Colletotrichum* presentan coincidencias en el rango de hospederos que dificultan su separación por métodos taxonómicos tradicionales basados en características como la morfología de los cultivos (Martín *et al.*, 2002), por ejemplo *C. acutatum* es considerada especie acumulativa, capaz de infectar una amplia variedad de plantas, al igual que *C. gloeosporioides* (Thaung, 2008).

La amplia variabilidad morfológica y la posible contribución de diferentes mecanismos a la variabilidad genética favorecen la capacidad de este patógeno para adaptarse (Masel *et al.*, 1990), además de ser de particular importancia en la evolución de los hongos asexuales (Chaozu *et al.*, 1998) como *C. acutatum*. En Colombia uno de los cultivos seriamente afectados por *C. acutatum* es el tomate de árbol (Saldarriaga *et al.*, 2008), frutal andino constituido en una de las nuevas opciones productivas más importantes para la región templada, cultivo tradicionalmente realizado por pequeños productores con un bajo nivel de tecnología y excesiva dependencia de productos químicos (Cadena, 2000; Lobo, 2001, 2006).

Algunos factores aumentan la fuerza de selección ejercida sobre las poblaciones de patógenos, tales como, 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. El control de estos fitopatógenos es muy deficiente, debido principalmente al desconocimiento de las relaciones de la enfermedad con sus fuentes de inóculo y sus niveles de variación (Cadauid *et al.*, 2007). No obstante, la caracterización correcta de un organismo permite conocer los patrones de comportamiento de la especie o del grupo taxonómico, facilita el acceso a la información científica y técnica generada, que puede ser aplicada en el desarrollo de alternativas tecnológicas para la estructuración de planes de manejo y su control (Saldarriaga *et al.*, 2008).

Actualmente en Colombia, especialmente en los departamentos de Nariño y Putumayo se carece de clara información referente a las especies, la taxonomía, diversidad genética, capacidad patogénica y la epidemiología de *C. acutatum*, por lo cual es muy restringido el conocimiento fundamental sobre la estructura poblacional del hongo en esta región. Este trabajo se constituye en un aporte inicial al conocimiento de la variabilidad intrapoblacional de *C. acutatum* procedente de *Solanum betaceum* de los departamentos de Nariño y Putumayo.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genotípicamente las poblaciones de *Colletotrichum acutatum* aisladas de *Solanum betaceum* (tomate de árbol) procedentes de los departamentos de Nariño y Putumayo.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la variabilidad genotípica de las diferentes poblaciones de *Colletotrichum acutatum* con base en polimorfismos generados por DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD).
- Comparar la variabilidad genotípica entre los aislamientos procedentes de los departamentos de Nariño y Putumayo.

6. HIPÓTESIS CIENTÍFICA DE TRABAJO

- Las poblaciones de *Colletotrichum acutatum* procedentes de cultivos de tomate de árbol de los departamentos de Nariño y Putumayo presentan alta variabilidad genotípica.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 ANTECEDENTES

Colletotrichum es uno de los más grandes géneros de hongos Coelomycetes, las especies patógenas están dotadas de una alta capacidad de adaptación, hecho que les confiere la capacidad de habitar distintos lugares bajo condiciones ambientales muy diversas (Negrete & Redondo, 1997). Razón por la cual, numerosos estudios se han enfocado a su caracterización, sin embargo los trabajos relacionados con la variabilidad genotípica en *Colletotrichum acutatum* en Colombia son escasos y en los departamentos de Nariño y Putumayo en aislamientos procedentes de tomate de árbol los reportados por el grupo de investigación GENPAT son los iniciales.

Sicard y colaboradores (1997) establecieron la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum*, en tres regiones de México, Ecuador y Argentina centros de diversidad de su hospedero *Phaseolus vulgaris*. Utilizaron RAPD y la virulencia de un conjunto de 12 cultivares para evaluar la diversidad genética de las cepas. Las poblaciones aisladas de México fueron las más polimórficas y las más distantes de Ecuador y Argentina. La mayoría de los alelos RAPD presentes en Ecuador y Argentina se encontraron en México, manifestando que las poblaciones andinas se han derivado desde el centro de Mesoamérica, resultados que sugieren una adaptación del patógeno a cultivares del mismo origen geográfico.

González y colaboradores (1998) caracterizaron 59 aislamientos de *Colletotrichum lindemuthianum* de diferentes regiones de México mediante cultivares diferenciales y marcadores moleculares. Determinaron diez razas distintas, las que infectaron una estrecha gama de los cultivares diferenciales de origen Mesoamericano. Una comparación de análisis de RAPD y AFLP se llevó a cabo en un subconjunto de aislamientos para determinar las distancias genéticas y la producción de un dendrograma en donde se demostró que ningún aislamiento es genéticamente idéntico a otro, además de presentar dos niveles de asociación: i) aislamientos clasificados según el tipo de cultivar o sistema de cultivo y ii) subgrupos más pequeños asociados con la ubicación geográfica de donde fueron obtenidos.

Kelemu y colaboradores (1999) evaluaron el grado de diversidad genética de 127 aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* en genotipos de *Stylosanthes guianensis* de América del Sur, mediante RAPD y RFLP. Los productos de RAPD revelaron polimorfismos puntuales entre los aislamientos, 63 de los 127 se agruparon en 13 linajes distintos que por lo general se correlacionaron con el origen geográfico. En el caso de aislamientos de diferentes regiones se agruparon según el hospedero de acogida. Concluyeron que es poco probable que la diversificación

genética se haya derivado de una sola introducción del hongo, indicando que muchos genotipos de *C. gloeosporioides* son endémicos de esta zona.

Casarrubias y colaboradores (2003) evaluaron la diversidad genética de 21 cepas monospóricas de *C. gloeosporioides* provenientes de frutos de papaya de tres regiones de México. Caracterizaron la variabilidad genética del hongo mediante la técnica RAPD, para lo cual usaron 18 oligonucleótidos decámeros de secuencias aleatorias, obtuvieron un dendrograma en el cual se observó la formación de dos grupos principales de cepas (A y B) ampliamente separados(100%), observándose una tendencia de acuerdo a su lugar de procedencia.

Álvarez y colaboradores (2005) identificaron y caracterizaron morfológica, genética y patogénicamente 54 aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de cultivos de guanábana en el Valle del Cauca. La caracterización se basó en morfología de la colonia, patogenicidad y reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando primers específicos ITS, *CaInt2* (*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 microsatélites (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 y colaboradores (2007) evaluaron 178 aislamientos de la colección nacional de *Colletotrichum* conformada por CORPOICA en el Laboratorio de Fitopatología en Tibaitatá (Bogotá, Colombia), mediante el análisis de las regiones intergénicas del DNA ribosomal (ITS) y la caracterización de la diversidad genética empleando marcadores RAPD y AFLP. Se identificaron 138 aislamientos como *C. acutatum* y los 40 restantes como *C. gloeosporioides*, el análisis de similaridad para RAPD y AFLP, mostró un nivel del 40 y 51 % respectivamente, una separación clara de dos grupos, correspondientes a las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Respecto al grupo de *C. acutatum* con un nivel de similaridad cercano al 60% se evidenciaron dos subgrupos pertenecientes a los hospederos de tomate de árbol y limón, indicandouna tendencia según el tipo de cultivar.

El grupo de investigación Genética de Patosistemas, GENPAT (Cuarto informe MADR, agosto 2010), 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 aislamientos de *Colletotrichum*, no obstante los aislamientos fueron a fines a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Por otra parte, mediante la amplificación de regiones ITS del RNAr con primers específicos, *CaInt2* (*C. acutatum*) y *CgInt* (*C. gloeosporioides*) se determinó que 103 de los aislamientos correspondían a *C. acutatum*.

7.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Existe controversia en la sistemática del género *Colletotrichum*, su historia taxonómica ha sido compleja implicando hasta 17 géneros sinónimos como *Vermicularia*, *Dicladium*, *Gloeosporium* y *Ellisiella*, entre otros (Sutton, 1992). Dependiendo de la “guía” taxonómica, el número de especies puede variar desde 23 a 700, aceptándose actualmente 39 (Sutton, 1992), entre las que se encuentran tanto saprófitas como parásitas. Para 1992 se describieron 900 especies de *Colletotrichum* y cerca de 600 variantes de *Colletotrichum gloeosporioides* distinguiéndose varias formas patogénicas basadas en los hospederos específicos y características culturales (Gutiérrez *et al.*, 2002).

El género *Colletotrichum* Corda fue descrito por Tode en 1790 bajo el nombre de *Vermicularia*, nombre que fue validado por Fries en 1825 (Baxter *et al.*, 1985). Penzig en 1882 describió a *Vermicularia gloeosporioides*, hoy conocido como *Colletotrichum gloeosporioides*, cuando fue aislado en Italia de las hojas de un cítrico (Walker, 1980). 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 (Baxter *et al.*, 1985). *Colletotrichum* fue establecido como género por Corda en el 1831, quien lo describió como un hongo caracterizado por acérvulos setosos y conidias hialinas y fusiformes (Baxter *et al.*, 1985). Von Arx (1970) describió el estado anamórfo de *Glomerella*, como género *Colletotrichum*, con acérvulos intra o subepidermales, con variaciones en tamaño y forma y glabrosos o setosos. Con setas oscuras u ocasionalmente casi hialinas que surgen de la base del acérvulo, con conidias elipsoidales, cilíndricas formando apresorios al germinar (Gaztambide, 2005).

En la clasificación tradicional de los hongos, el género *Colletotrichum* se incluye en la división *Eumycota* (del griego *eu*, verdadero, y *mykes*, hongo), hongo lisotrófico o filamentoso que contiene quitina en sus paredes celulares y que carece de estructuras con movilidad propia (Arroyo, 2004), subdivisión *Deuteromycotina*, clase *Coelomycetes* y orden *Melanconiales* (Ainsworth, 1971). Si se clasifica este género atendiendo a su teleomórfo *Glomerella*, es decir desechando la Subdivisión artificial *Deuteromycotina*, se encuadra en el Phylum *Ascomycota*, Clase *Ascomycetes*, Subclase *Sordariomycetidae*, Orden *incertae sedis* y Familia *Glomerellaceae* (Kirk *et al.*, 2001). Según National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2007), mediante la caracterización molecular por ITS la clasificación para *Colletotrichum* spp. es:

Dominio: Eukaryota
Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes incertae sedis
Orden: Phyllachorales
Familia: Phyllachoraceae mitospóricos

Género: *Glomerella* (anamorfo: *Colletotrichum*)

Mientras que los límites genéricos son hoy relativamente bien definidos, el concepto de especie del género *Colletotrichum* no está bien establecido, ni universalmente aceptado (Sutton, 1992). Las características morfológicas y rango de hospederos se han utilizado tradicionalmente para definir la especie, aunque la dependencia excesiva de este último ha dado lugar a una proliferación innecesaria de nombres (Wharton & Diéguez, 2004). Esto puede deberse en parte a la amplia gama de hospederos de un número de especies de *Colletotrichum* y el hecho de que varias especies de *Colletotrichum* se asocien a un único hospedero (Freeman, Katan & Shabi, 1998).

Anteriormente, la identificación de los hongos se basaba en las características morfológicas de las esporas o conidias, estructuras sexuales y vegetativas, conjuntamente con los caracteres culturales (Gunnell y Gubler, 1992; Adaskaveg & Hartin, 1997). Desafortunadamente, la morfología conidial varía dentro de los aislamientos de una misma especie dificultando la identificación clásica (Bailey & Jeger, 1992), en consecuencia ha sido necesario complementar estos métodos clásicos con técnicas bioquímicas y moleculares, como análisis de isoenzimas, detección de minicromosomas mediante electroforesis en gel, secuencias de DNA y anticuerpos monoclonales (Denoyes *et al.*, 2002; Ureña-Padilla, 2002).

7.3 BIOLOGÍA DE *Colletotrichum acutatum*

Esta especie era considerada una de las muchas variantes morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., *Colletotrichum acutatum* fue descrita por primera vez como una especie nueva por Simmonds en 1965 (Wharton & Diéguez, 2004). En la actualidad *C. acutatum* es reconocida como un patógeno común de una amplia gama de cultivos y especies de plantas no cultivadas (Adaskaveg & Hartin, 1997; Wharton & Diéguez, 2004).

C. acutatum es una de las especies que están entre los hongos patógenos más prolíferos en las regiones tropicales, subtropicales y templadas. *C. acutatum* se ha aislado en una gran diversidad de ambientes y se ha reconocido como uno de los agentes causales de la enfermedad comúnmente denominada antracnosis, la cual afecta frutos, flores, hojas y tallos en un amplio rango de plantas (Gutierrez *et al.*, 2002). 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.

En el ciclo de vida de *C. acutatum* se exhiben dos fases principales de nutrición durante la colonización de la planta (Figura 1); la fase inicial biotrófica (corta duración) obtiene los alimentos de las células vivas, fase en la que se asegura el establecimiento del patógeno, sin daños severos en el tejido vegetal, y la segunda fase necrotrófica, fase tardía donde los alimentos se obtienen de las células hospederas muertas a causa del ataque del patógeno. La expresión enzimática para degradar la pared vegetal está estrictamente limitada durante la fase biotrófica y la planta

hospedera parece no reconocer al patógeno y 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).

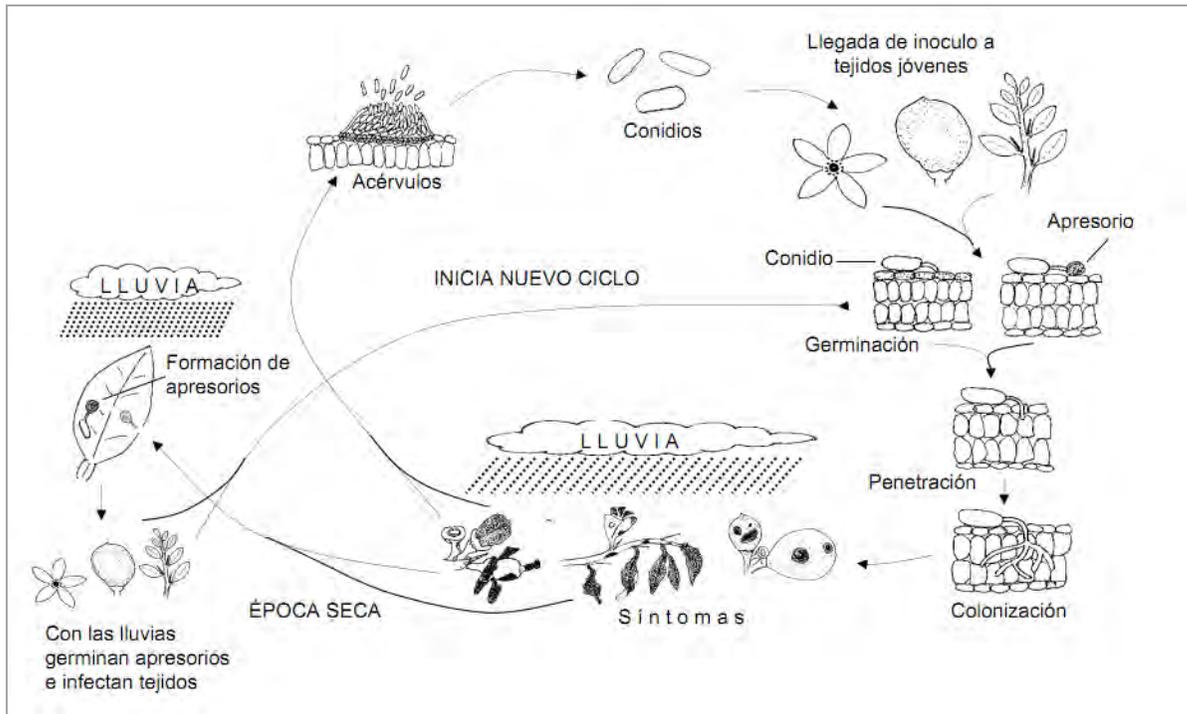


Figura 1. Ciclo de vida de *Colletotrichum acutatum* agente causal de la antracnosis. Fuente: Orozco & Timmer (2005).

7.3.1 Características de *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds (1965).

Se caracteriza por presentar sobre cultivo en agar papa dextrosa (PDA) colonias blancas, variando su coloración a gris salmón y marrón oscuro grisáceo, en la superficie inferior se muestra de color beige o crema con zonas rosadas anaranjadas debido a las masas de conidias (Gunnell & Gubler, 1992; Adaskaveg & Hartin, 1997). El crecimiento es lento comparado con otras especies de *Colletotrichum*, alcanzando de 8 a 9 mm/día, su temperatura óptima se encuentra entre 25 y 26,8 °C, el micelio es hialino, pero con el tiempo se torna oscuro y por lo general su margen es abrupto. Los esclerocios están ausentes pero forma apresorios obovados, claviformes o ligeramente irregulares, de color marrón claro a marrón oscuro, con las márgenes enteras o ligeramente lobuladas y su tamaño oscila entre 8,5 - 10 x 4,5 - 6 µm (Gunnell & Gubler, 1992; Adaskaveg & Hartin, 1997).

La producción de conidias es característicamente abundante en esta especie, en masa se observan de color salmón anaranjado, su morfología varía desde cilíndrica con ambos extremos

redondeados a fusiformes, con ambos extremos puntiagudos e intermedia con un extremo redondeado y otro afilado y su tamaño oscila entre 8,5 - 16,5 x 2,5 - 4 μm . Los estudios epidemiológicos han mostrado una posible ventaja evolutiva de *C. acutatum* sobre otras especies de *Colletotrichum* por cuanto además de presentar mayor densidad de conidias en los acérvulos, su liberación resulta más fácil (Wharton & Diéguez, 2004). Las setas suelen ser escasas si se producen, los apresorios pigmentados surgen en la germinación de las conidias y varían en forma y tamaño (Peres *et al.*, 2005). *C. acutatum* no es medianamente tolerante a benomil (Adaskaveg & Hartin, 1997; Pérez *et al.*, 2003), sin embargo, es mucho más sensible que a otras especies de *Colletotrichum* (Pérez *et al.*, 2003).

El estado sexual de determinados subgrupos genéticos de *C. acutatum* se ha caracterizado en condiciones de laboratorio y ha sido designado como *Glomerella acutata* (Guerber & Correll, 2001). Guerber y Correll (2001) encontraron que un gran número de aislamientos eran capaces de un apareamiento y formación de peritecios maduros en cultivo. Los cruces dentro de diferentes grupos de aislamientos expresaron alta, baja o infertilidad. Mostrando que la capacidad de compatibilidad de acoplamiento en *C. acutatum* y otras especies de *Colletotrichum* es compleja (Guerber & Correll, 2001; Wharton & Diéguez, 2004).

7.3.2 Reproducción y Genética

El ciclo de vida de las especies de *Colletotrichum* comprende una fase sexual y una fase asexual (Wharton & Diéguez, 2004). En términos generales, el estado sexual le confiere variabilidad genética y la fase asexual es responsable de la dispersión del hongo (Freeman *et al.*, 2000). La recombinación sexual en la mayoría de las especies de *Colletotrichum* es rara en la naturaleza y hasta la fecha sólo 11 de las cerca de 20 especies presentan teleomórfos *Glomerella* (Wharton & Diéguez, 2004). Por otra parte, la reproducción sexual en *Glomerella* es más compleja de lo que es habitual para la mayoría de los hongos ascomicetos.

Las especies de hongos que se reproducen sexualmente por lo general se pueden clasificar como auto-fértiles (homotálicos), o auto-estériles (heterotálicos). No obstante, en *Glomerella* dentro de una sola especie algunas cepas son auto-fértiles y fértiles cruzadas, mientras que otras son fértiles cruzadas pero auto-estériles (Chilton & Wheeler, 1949). La fase sexual de *C. acutatum* nunca se ha encontrado en la naturaleza, sin embargo, los estudios han demostrado que existe gran diversidad genética y heterogeneidad dentro de esta especie (Johnston & Jones, 1997; Freeman *et al.*, 2000). Una hipótesis de esta diversidad es la existencia de recombinación sexual entre las cepas del hongo, y la evidencia proviene de estudios recientes en los que el teleomórfo *Glomerella acutata* se generó artificialmente (Guerber & Correll, 2001).

Otro mecanismo por el cual se genera diversidad genética en las poblaciones de *C. acutatum* es a través de compatibilidad vegetativa, que hace referencia a la capacidad de cada una de las cepas

que se someterse a mutua anastomosis hifal dando lugar a células viables fusionadas que contienen núcleos de ambas cepas de los precursores en un citoplasma común (Katan *et al.*, 1996).

Dado que la reproducción de muchas poblaciones de *Colletotrichum* exclusiva o fundamentalmente vegetativa, los mecanismos por los cuales se genera variabilidad genética con intercambio de material genético es la anastomosis y heterocariosis. Estos procesos ocurren entre algunos aislamientos de *Colletotrichum*, sin embargo en algunos casos parecen estar restringidos por la existencia de incompatibilidad vegetativa (Brooker *et al.*, 1991) y las cepas que no pueden formar un *Heterokaryon* viable son en efecto genéticamente aisladas (Katan *et al.*, 1996).

7.3.3 Mecanismos de variabilidad genética en hongos

Cambios eventuales en el ambiente físico natural, características genéticas de la población del hospedero y la presencia de fungicidas en el ambiente (Arauz, 1998), son condiciones a las que frecuentemente los hongos deben adaptarse. Para ello utilizan mecanismos que generan su variabilidad genética:

7.3.3.1 Mutación

La mutación consiste en un cambio en la secuencia de nucleótidos del DNA del hongo, el cual resulta en una expresión fenotípica diferente del gen mutante con respecto al original (Arauz, 1998), que es transmisible por herencia a la progenie. En los hongos haploides estas se expresan inmediatamente, mientras que en los diploides y dicarióticos, las mutaciones se pueden mantener ocultas, debido a que generalmente son recesivas (Rivera, 2007), en estos casos la expresión fenotípica del nuevo carácter ocurre cuando el azar permite reunir los alelos en un individuo (Rivera, 2007).

Las mutaciones son cambios en las secuencias de DNA, bien sea por sustitución de una base por otra, por adición o delección de uno o muchos pares de bases. Los cambios se pueden originar por amplificación de segmentos particulares de DNA en copias múltiples, por inserción de un fragmento de DNA móvil en una secuencia codificadora de un gen y por inversión de un segmento de DNA. Las mutaciones ocurren de manera espontánea en los organismos vivos, tanto si se producen por vías sexuales, asexuales o ambas, consecuentemente son la fuente más importante de origen de las variaciones (Díaz *et al.*, 2001). La intensidad con que una mutación altera la diversidad de la población de un patógeno va a depender 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 & Silk, 1997).

Es probable que las mutaciones en los patógenos aparezcan con la misma frecuencia que en otros seres vivos, pero la capacidad multiplicativa amplifica dicho fenómeno (Wharton & Diéguez, 2004). Las mutaciones en el patógeno pueden además ser amplificadas por el hecho de cultivar variedades susceptibles o resistentes, genéticamente uniformes, de manera general. El cultivo de variedades resistentes de forma generalizada y uniforme duplica y propicia la aparición de cepas más virulentas (Araya, 1993).

7.3.3.2 Herencia citoplasmática

La herencia citoplasmática o extracromosómica está regida por DNA no ubicado en el núcleo, esta forma no está sujeta a las leyes mendelianas y permite a un patógeno adquirir nuevas características como por ejemplo: la capacidad de tolerar un fungicida, utilizar nuevos sustratos como fuentes de energía y cambiar su virulencia. Las plantas y los patógenos tienen ácido nucleico (DNA) tanto en el núcleo como en el citoplasma celular, el DNA de ambos puede mutar con la misma asiduidad, pero la herencia de las características controladas por el DNA extracelular (herencia citoplasmática) es más difícil de detectar. En el citoplasma se han detectado cambios en el material genético que le han generado al patógeno la capacidad de tolerar sustancias que anteriormente fueron tóxicas y poseer nuevas sustancias para crecer y modificar su virulencia.

7.3.3.3 Recombinación

La recombinación se da en hongos poseedores de estados teleomórficos o sexuales, en sus ciclos de vida (Rivera, 2007). La recombinación se origina cuando dos gametos haploides (n) se unen para formar el cigoto ($2n$). Posteriormente, en la meiosis se producen entrecruzamientos, donde partes de la cromátida del cromosoma de un par se intercambian con la de otro, como resultado de este proceso pueden aparecer variantes para diversos caracteres (Rivera, 2007). De este modo la progenie puede adquirir características nuevas que le permiten evadir la resistencia del hospedero o el efecto de un fungicida específico sobre su metabolismo (Rivera, 2007).

La recombinación genética es el proceso mediante el cual la información genética se redistribuye, con la cual se produce variación en la descendencia y diversidad dentro de cada especie. Este proceso ocurre cuando los genes de cada locus del cromosoma se entrecruzan para dar origen a nuevas combinaciones genéticas. Existen varios factores que producen efectos en la recombinación como lo son, las condiciones ambientales y los factores genéticos (Díaz *et al.*, 2001).

En los hongos los gametos o núcleos haploides se suelen dividir mitóticamente, por lo cual no hay un intercambio de material genético entre individuos diferentes, y los descendientes son relativamente uniformes, aunque esta homogeneidad no sea estricta (Wharton & Diéguez,

2004).No obstante, existen otros mecanismos de generación de variabilidad genética en los hongos de reproducción asexual:

a. Heterocariosis

Es una característica genética propia de los hongos, que consiste en la coexistencia de núcleos genéticamente diferentes en un citoplasma común, esto ocurre cuando dos hifas haploides se unen por medio de anastomosis y hay migración nuclear, de tal manera que en una misma hifa o célula quedan dos o más núcleos diferentes (Arauz, 1998). La célula se une a otra por penetración, normalmente, vacía su contenido en ella y los núcleos genéticamente distintos existentes en hongos heterocarióticos se segregan, se crean hifas fenotípicamente distintas (Figura 2). Esta condición permite al organismo adquirir características distintas a las producidas por los organismos homocarióticos originales. Así, aunque sólo haya dos tipos diferentes de núcleos en un micelio pueden obtenerse tres fenotipos distintos (Rivera, 2007). Es por ello la heterocariosis es muy importante en la genética y en la evolución de los hongos.

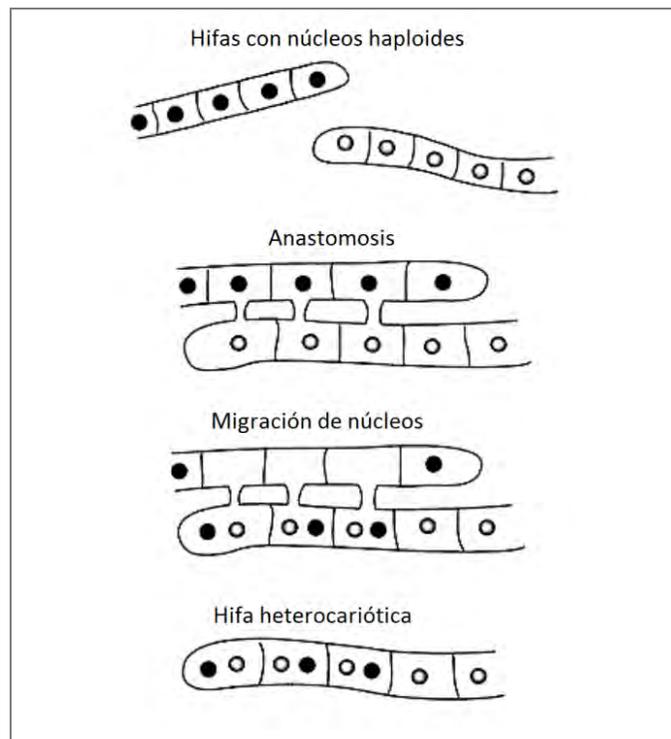


Figura 2. Esquema ilustrativo del proceso que origina heterocariosis en hongos. Fuente: Rivera (2007).

Esta condición se puede producir por unión de hifas (por anastomosis o somatogamia) genéticamente diferentes, por mutación de un núcleo dentro de una célula multinucleada, el cual luego se multiplica, o por gemación de una espora heterocariótica. Aunque en este caso no hay

fusión nuclear ni recombinación genética, las características genéticas de los distintos núcleos se expresan en mayor o menor proporción, y el individuo heterocariótico presenta una expresión fenotípica distinta a la del organismo homocariótico original(Arauz, 1998).

b. Parasexualismo

Pontecorvo (1956) definió como parasexual a cualquier sistema genético que origina recombinación genética por procesos distintos a los que fundamentalmente constituyen la reproducción sexual: la meiosis y la fecundación.

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. Este proceso da inicio con la formación de hifas o células heterocarióticas (núcleos haploides diferentes), ocasionalmente estos núcleos se fusionan originando estados diploides. Frecuentemente, este estado se perpetúa por división mitótica, pero en algunos casos ocurre una meiosis espontánea(Rivera, 2007), resultando recombinaciones de caracteres que dan origen a genotipos muy distintos a los precursores (Figura3). Durante la multiplicación de estos núcleos diploides puede ocurrir intercambio genético entre cromosomas (entrecruzamiento mitótico) dando lugar a nuevas combinaciones y los nuevos núcleos pueden ser luego incorporados en esporas asexuales.

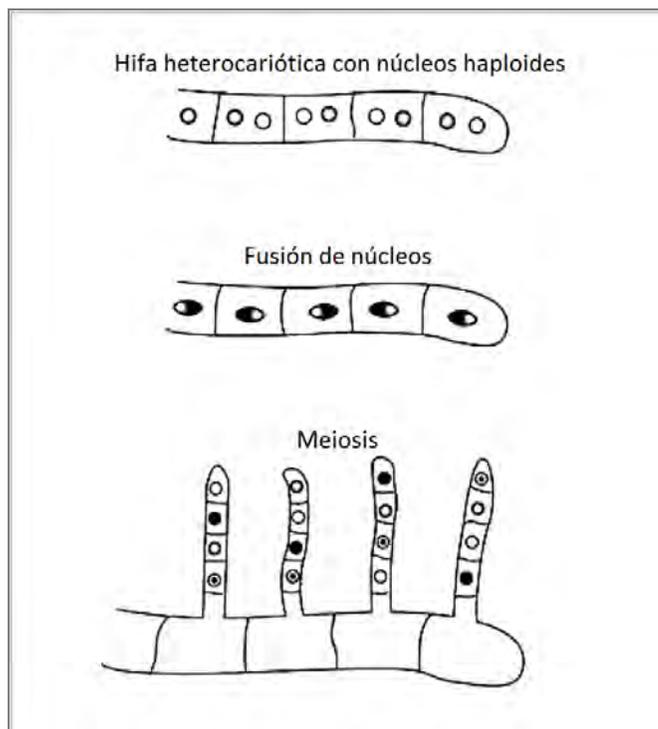


Figura 3. Esquema ilustrativo del proceso de parasexualismo en hongos. Fuente: Rivera (2007).

En los hongos la recombinación mitótica producida por sobrecruzamiento somático es el mecanismo parasexual por excelencia (Lacadena, 1996). Aunque este proceso produce variabilidad genética en forma menos eficiente que una verdadera reproducción sexual, es de primordial importancia para la variabilidad genética de organismos que no presentan reproducción sexual (Arauz, 1998).

7.3.3.4 Heteroploidia

La existencia de células, tejidos u organismos completos con números cromosómicos diferentes n ó $2n$, normal de la especie. Por lo tanto, el número de cromosomas puede ser haploide, diploide, triploide, tetraploide, aneuploide (núcleos con uno o más cromosomas extras o faltantes). La heteroploidia se ha observado en muchos hongos, la cual afecta características como, tasa de crecimiento, tamaño y cantidad de las esporas, color de las hifas, actividad enzimática y patogenicidad (Rivera, 2007). En algunos trabajos se han encontrado esporas de un mismo hongo que tienen núcleos con números cromosómicos que van de 2 a 12 por núcleo (Rivera, 2007), esta distribución indica el suplemento de variabilidad que pueden utilizar las hifas aneuploides.

7.3.3.5 Flujo genético

Este fenómeno origina cambios en la población puesto que permite la introducción de nuevos genes, el flujo genético opera cuando no hay obstáculos culturales ni geográficos. El flujo genético es el único mecanismo por medio del cual las poblaciones se vuelven genéticamente homogéneas al mismo tiempo que forman un patrimonio genético común (Díaz *et al.*, 2001). Las migraciones de una población hacia áreas ocupadas por una segunda población pueden producir flujo genético.

Algunas poblaciones han visto alterada su frecuencia genética debido al entrecruzamiento de genes entre una población cercana a otra, debido a que la población puede recibir alelos de una población inmigrante que presenta alelos diferentes (Díaz *et al.*, 2001). El flujo de genes en las poblaciones se da a largas distancias tanto como en regiones locales, conduce a la aparición de nuevos patotipos en áreas donde previamente estuvieron ausentes, siendo uno de los mecanismos más importantes para la generación de variabilidad genética en organismos con reproducción sexual.

Además de estos procesos han sido propuestos varios mecanismos que pueden tener un papel importante en la generación de variación para el género *Colletotrichum*, como los reordenamientos cromosómicos (Masel *et al.*, 1990), en los que se incluyen la recombinación parcial o supresión cromosómica total, recíproca y no recíproca entre los cromosomas homólogos, y la recombinación ectópica entre cromosomas no homólogos (Chaozu *et al.*, 1998), estos mecanismos de generación de cariotipos variables son probablemente activos, ya sea durante el

crecimiento somático o recombinación parasexual, lo que puede contribuir a una considerable variación y a la capacidad de este patógeno para adaptarse (Masel *et al.*, 1990). Sicard y colaboradores (1997) sugieren que el desmembramiento de cromosomas más grandes y los procesos de división irregulares que dan lugar a un polimorfismo cromosómico podrían ser responsables de la variación genética en *Colletotrichum lindemuthianum*. O'Sullivan y colaboradores (1998) sugirieron que la mitosis en forma asexual tiene flexibilidad en la pérdida y la ganancia de los cromosomas dando lugar a arreglos del genoma. Por ello la variación en el cariotipo puede ser de particular importancia en la evolución de los hongos asexuales, que son potencialmente limitados en su capacidad de generar variación genotípica (Chaozu *et al.*, 1998).

7.4 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE *Colletotrichum acutatum*

Los estudios sobre la genética en los hongos patógenos 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 DNA y PCR se usan para diagnóstico, identificación, taxonomía y su sistemática (Manzo *et al.*, 2001).

El género *Colletotrichum* contiene una colección extremadamente diversa que incluye hongos tanto saprofitos como patógenos. Estos últimos inicialmente se nombraron de acuerdo con la planta hospedera la cual no fue 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 basaron 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. Debido a la influencia ambiental sobre las características morfológicas y la existencia de formas intermedias, estos criterios no son los adecuados para una confiable diferenciación interespecífica de *Colletotrichum*.

Las herramientas moleculares han ganado aceptación en los últimos años, siendo empleadas para diferenciar entre poblaciones de *Colletotrichum* en diferentes hospederos y también para diferenciar entre especies y subespecies que por métodos tradicionales no es posible. En *Colletotrichum* los estudios se han concentrado en dos partes del genoma: el DNA mitocondrial (DNAm) y ribosomal (DNAr) ambos presentes como múltiples copias dentro de la célula; además de estos genes, se ha incrementado el uso de secuencias de genes como la β tubulina, el factor de Elongación 1 alpha (EF-1 α), (Freeman, Katan & Shabi, 1996, 1998), regiones codificadoras del DNA ribosomal (ITS) y particularmente marcadores moleculares como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNAs*) y AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) para determinar la posible existencia de niveles aparentes de variabilidad genética en la población (Freeman, Katan & Shabi, 1998).

7.4.1 Polimorfismo del DNA Amplificado al Azar (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)

Las técnicas moleculares que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en los ensayos de amplificación de DNA han proporcionado nuevos conocimientos sobre las tendencias de sistemática y evolución de los diferentes organismos. Sin embargo, una limitación para la implantación inmediata de toda la escala de la tecnología PCR, es el diseño y síntesis de los iniciadores, por lo que se requiere del conocimiento previo del genoma del organismo (Walker & Rapley, 2008). Para resolver esta limitación, un ensayo basado en PCR llamado polimorfismo del DNA Amplificado al Azar (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), fue descrito como un método de PCR rápido y sensible que permite la identificación de un gran número de loci genéticos independientes del sitio (William *et al.*, 1990).

Esta técnica ha sido desarrollada para el mapeo genético, “fingerprinting”, y es ampliamente utilizado en los análisis de polimorfismos inter e intraespecífico de las poblaciones. Ha demostrado ser una herramienta potente para discriminar diferentes especies o subespecies, y para el análisis de las relaciones filogenéticas entre las cepas o poblaciones para una variedad de microorganismos, plantas y mamíferos (Walker & Rapley, 2008).

RAPD combina simplicidad sin radiactividad, la aceptación de un número ilimitado de primers, sin requisitos de conocimientos previos de las secuencias que se amplifica, evalúa un gran número de loci de forma simultánea, en un tiempo mucho más corto que la detección de otros ensayos genéticos. Por lo tanto, los perfiles de RAPD se mantienen estables, y, presentan buena reproducibilidad si sus condiciones son controladas, incluso cuando se utiliza el DNA de diferentes extracciones o la misma muestra en condiciones diferentes (Williams *et al.*, 1990; Bardakci, 2001).

El análisis ha mostrado que una de las causas de los polimorfismos RAPD son los reordenamientos cromosómicos, tales como inserciones/deleciones (Walker & Rapley, 2008). Por lo tanto, los productos de amplificación de los mismos alelos en un heterocigoto difieren en longitud y se detecta como presencia o ausencia de bandas en el perfil de RAPD.

7.4.1.1 Principio de la técnica de RAPD

El análisis RAPD se basa en la amplificación del DNA genómico con un primer corto (diez bases) de secuencia elegida arbitrariamente, que se une a secuencias complementarias de ambas cadenas de DNA, lo que resulta en la amplificación de las regiones que intervienen (Walker & Rapley, 2008). La amplificación de la reacción procede en condiciones de baja severidad lo que permite la existencia de vinculación entre primers y DNA 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 DNA sea la misma en cada muestra variando de 20 a 30 ng 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 DNA (Bardakci, 2001). La concentración de DNA 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%, se tiñen con bromuro de etidio o mediante espectrofotometría a 260-280nm con 10 µL de DNA molde (Walker & Rapley, 2008).

La elección adecuada del conjunto de primers 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 sometidos a análisis es necesario. 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.

Los primers diseñados utilizados al azar poseen cada uno propias condiciones óptimas de reacción y reactivos (Bardakci, 2001). Las secuencias de los primers RAPD que generan el mejor patrón de DNA para la diferenciación debe ser determinada empíricamente. Por lo general, los marcadores RAPD son detectados por el uso de primers aleatorios decámeros con 50-80% de contenido de C G son los más adecuados, no obstante depende del organismo de estudio (Bardakci, 2001; Walker & Rapley, 2008).

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 ÁREA DE ESTUDIO

Las cepas de *C. acutatum* fueron aisladas de la región sur occidental de Colombia en los departamentos de Nariño y Putumayo en un estudio previo realizado por el grupo de investigación Genética de Patosistemas en los años 2008 – 2009; los aislamientos evaluados son preservados y mantenidos en el cerapio de *Colletotrichum* spp. de la Universidad de Nariño.

El departamento de Nariño está situado en el extremo sur occidente del país (Figura 4), en la frontera con la República del Ecuador; localizado entre los 00°31'08" y 02°41'08" de latitud norte, y los 76°51'19" y 79°01'34" de longitud oeste (García, 2004), el rasgo más sobresaliente del departamento es la región Andina, debido que al penetrar la cordillera de los Andes forma el nudo de Los Pastos, de donde se desprenden dos ramales: la cordillera Occidental y la cordillera Centro - Oriental, la vertiente amazónica u oriental presenta terrenos abruptos cubiertos por bosques húmedos; el relieve permite que el departamento de Nariño presente temperaturas cálidas, templadas, frías y de páramo (Martínez, 2007).

El departamento de Putumayo está situado en el sur del país (Figura 4), localizado entre 01°26'18" y 00°27'37" latitud norte, y 73°50'39" y 77°4'58" longitud oeste (García, 2004), las cepas fueron aisladas específicamente del Valle de Sibundoy, Alto Putumayo que comprende los municipios de Santiago (1.15'N 77.01'O), Colón (1,11'N 76.58'O), Sibundoy (1.18'N 76.89'O) y San Francisco (1.18'N 76.88'O), municipios que hacen parte de la región Andino-Amazónica del departamento del Putumayo, corresponden a una región montañosa, en la que sobresalen los cerros Patascoy y Putumayo con alturas que sobrepasan los 3.500 m y en la que se encuentran climas cálido, medio, frío y páramo (Martínez, 2007). La temperatura media anual es de 16.3 °C, con T° máxima de 21.7 °C y una T° mínima de 10.3 °C, humedad relativa del 85%, precipitación anual de 1.400 mm aprox. y una altitud que varía entre los 2.000 y 3.700 m.s.n.m. (ACN, 2010).

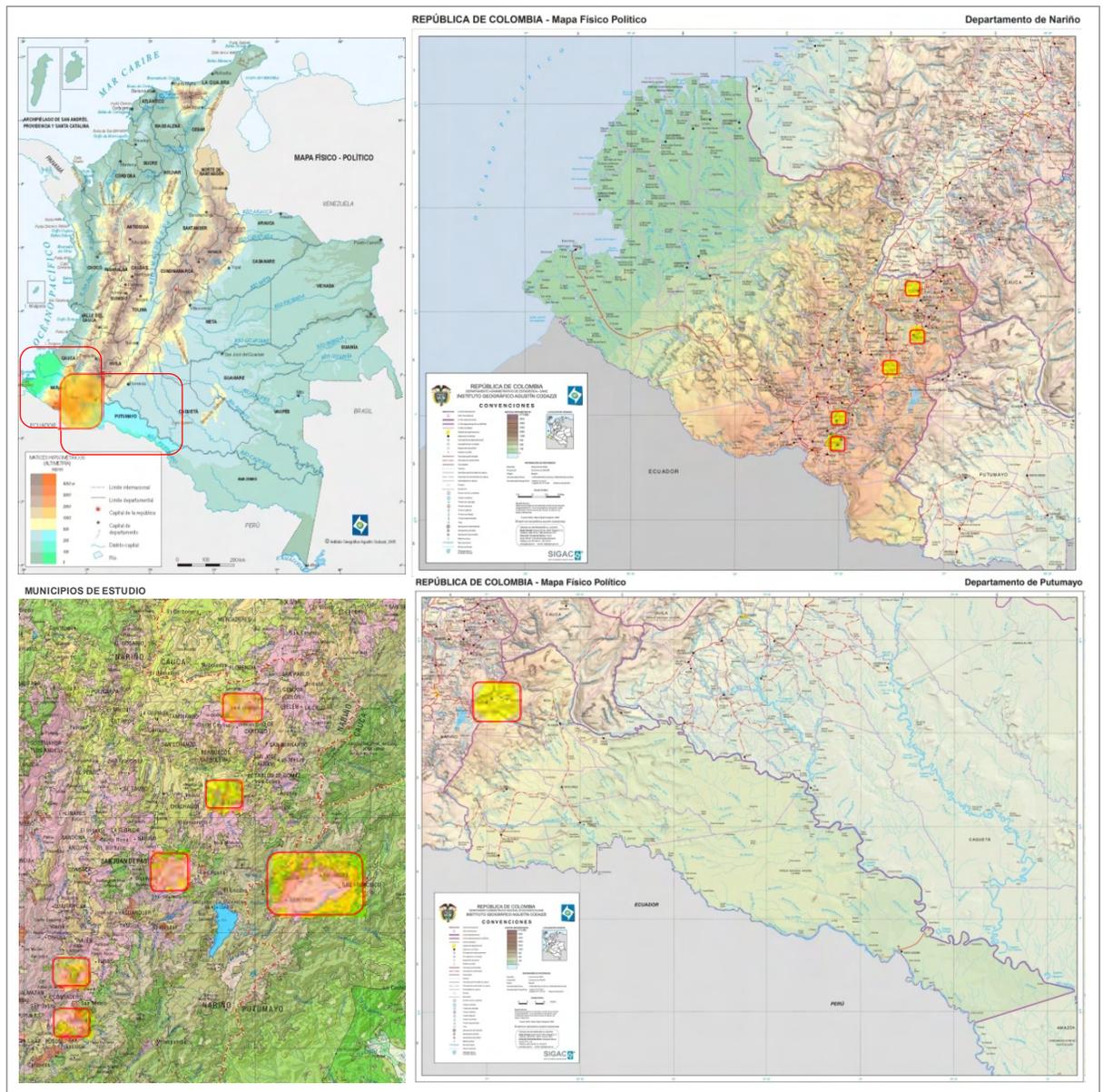


Figura 4. Localización de los departamentos de Nariño y Putumayo en Colombia, y de los diferentes municipios (amarillo) de donde proceden los aislamientos de *Colletotrichum acutatum*. Fuentes: Aristide (2012), IGAC (2003).

8.2 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS

En el presente estudio se evaluaron 25 aislamientos de *C. acutatum* provenientes de huertas caseras y cultivos de tomate de árbol (Tabla 1), colectados de veredas y el casco urbano de diferentes municipios de los departamentos de Nariño y Putumayo muestreados entre los años 2008 – 2009 por el grupo de investigación Genética de Patosistemas.

Tabla 1. Aislamientos de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) de los departamentos de Nariño y Putumayo. Fuente: Esta investigación

Cepa N°	Código de colección*	Localización	Cultivar	Fungicidas	observaciones
NARIÑO					
1	MN8012	Mapachico / Pasto	Común	No fumiga	Huerta casera
2	MN9048	Medina Orejuela / Buesaco	No registra	No fumiga	Cultivo abandonado
3	MN9057	Medina Orejuela / Buesaco	No registra	No fumiga	Cultivo
4	MN9067	Llano largo / Buesaco	No registra	No registra	Cultivo
5	MN9083	Rosal del monte / Buesaco	Común	No fumiga	Cultivo
6	MN9097	Iles / san Juan	Varón	Dithane, Fitoraz	Cultivo, Fumiga cada 8 días
7	MN9261	B. El Sauce/ La Unión	Amarillo	Mancozeb, Cimoxamil	Cultivo, Fumiga cada 8 días
8	MN9285	Córdoba	Manzano	Antracol, Carbendazim	Cultivo
9	MN9293	Córdoba	Pata de perro	Opera, Vitavax	Cultivo
10	MN9295	Córdoba	Pata de perro	Daconil, Manzate, Ridomil	Cultivo
PUTUMAYO					
11	MP8003	Muchivioy / Santiago	Holandés	Daconil, Brestanid, Ridomil, Fitoraz	Cultivo
12	MP8013	La Y / Santiago	Común	No fumiga	Huerta casera
13	MP8047	Vichoy / Santiago	Común	Ridomil, Carbendazim	Fumiga cada mes
14	MP8070	B. San Pedro-Las Lajas / Colón	Hibrido/común	Score, Brestanid, Carbendazim	Cultivo intercalado – fríjol
15	MP8072	B. San Pedro-Las Lajas / Colón	Hibrido	Score, Brestanid, Carbendazim	Cultivo intercalado – fríjol
16	MP8078	B. La Josefina / Colón	No registra	No registra	---
17	MP8088	Tamauca Vieja / Santiago	No registra	No registra	---
18	MP9118	B. Botero / San Francisco	Común	No fumiga	---
19	MP9133	San Silvestre/ San Francisco	Holandés	Ridomil, Daconil y Fitoraz	Cultivo abandonado, guía para frijol
20	MP9146	Las Cochass/Sibundoy	Común	Si fumiga	Cultivo intercalado – fríjol
21	MP9168	Central San Antonio / San Francisco	No registra	No registra	---
22	MP9172	San Félix/Sibundoy	Hibrido	No registra	Huerta casera
23	MP9175	B. Sagrado / Sibundoy	Holandés	Mancozeb, Cimoxamil	Fumiga cada 8 días
24	MP9187	B. Fátima / Sibundoy	Común	No registra	---
25	MP9192	San Félix/Sibundoy	Injerto	Si fumiga	Fumiga cada 15 días

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

Los aislamientos se seleccionaron teniendo en cuenta representatividad en los sitios muestreados y el cultivar de procedencia, además se registró si el cultivo de origen tuvo algún tipo de manejo con fungicidas (Anexo 1, morfología de los aislamientos). La evaluación de las diferentes cepas de *C. acutatum* se realizó con muestras obtenidas de nueve municipios, diez cepas de cinco municipios del departamento de Nariño (Pasto, Iles, Córdoba, La Unión y Buesaco) y 15 cepas de los cuatro municipios que componen el Valle de Sibundoy (Santiago, Colon, San Francisco y Sibundoy), además se utilizó un control positivo para *C. acutatum* y un control alterno correspondiente a *C. gloeosporioides*, ambos fueron caracterizados molecularmente y proporcionados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT (Dra. Lucia Afanador).

8.3 OBTENCIÓN DE DNA A PARTIR DE MICELIO

8.3.1 Siembra de aislamientos

Se realizó la siembra a partir de aislamientos monospóricos mantenidos en cajas petri en medio de cultivo líquido Papa Dextrosa (PDA) suplementado con cloranfenicol, almacenados a temperatura ambiente. Cada uno se sembró en 20 ml de caldo papa suplementado con peptona y sacarosa (200 g papa, 4 g peptona, 8 g sacarosa, 1 000 ml agua destilada); para ello se retiró parte de la superficie del hongo con una asa estéril con el fin de obtener la mayor cantidad posible de esporas. De cada aislamiento se sembraron cuatro repeticiones en frascos de tapa rosca con el fin de obtener suficiente cantidad de micelio para la extracción de DNA, se incubaron entre ocho y diez días a temperatura ambiente en oscuridad total, tiempo en el cual el micelio cubrió en su totalidad la superficie del caldo de cultivo.

Posteriormente, el micelio se retiró de la superficie eliminando el exceso de medio de cultivo con agua destilada estéril, se realizó un secado con papel filtro y toallas absorbentes estériles para después permanecer en cámara de flujo laminar con aire y mechero por dos días, finalmente el micelio fue macerado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino almacenado en tubos Falcon de 15 ml a -20 °C.

8.3.2 Extracción de DNA

Para la optimización de la extracción de DNA de los aislamientos de *C. acutatum*, se utilizó el siguiente protocolo:

8.3.2.1 Protocolo de extracción directo Griffith Gareth y Shaw David, 1998

Para la optimización de la extracción de DNA de los diferentes aislamientos de *Colletotrichum acutatum*, se utilizó el protocolo de extracción directo de Griffith y Shaw (1998), con algunas

modificaciones: se agregó 35 mg de micelio seco y macerado de cada uno de los aislamientos en tubos Eppendorf estériles de 2 mL, a cada uno se le adicionó 800 μ L de buffer de extracción CTAB (NaCl 1.4 M, EDTA pH 8.0 20 mM, Tris HCl pH 8.0 100 mM, CTAB 2 %), 1,5 μ L de proteinasa K, la mezcla fue agitada vigorosamente e incubada a baño maría a 60°C durante 1 hora. Después de la incubación, se adicionó 600 μ L de cloroformo, se agitó por 10 segundos y la mezcla fue centrifugada a 17.000 g durante 10 minutos en una microcentrifuga Hermle Z233 M-2. Se extrajo el sobrenadante (alrededor de 600 μ L) el cual se transfirió a un tubo nuevo, a este se le adicionó 0,6 volúmenes de isopropanol frío (60 μ L por cada 100 μ L), se agitó por inversión, se dejó en posición vertical a temperatura ambiente por 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 17.000 g por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, el pellet observado fue lavado con 1 ml de etanol al 70 %, se agitó por inversión y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se centrifugó a 17.000 g por 10 minutos y se mantuvo a temperatura ambiente durante el tiempo suficiente para remover cualquier traza de etanol (2 - 4 horas), posteriormente el pellet se resuspendió en 60 μ L de agua estéril libre de nucleasas, el cual se trató con 3 μ L de RNAasa e incubación durante 2 horas a 37°C y finalmente fue almacenado a -20 °C.

La integridad del DNA se verificó por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa (Agarose I™, marca AMRESCO) al 0,9%, teñido con 3 μ L de Bromuro de etidio (0.5 mg/ml), se dejó correr a 100 voltios por 60 minutos, en tampón TBE 1X y se visualizó utilizando un benchtop UV transilluminators 3UV™. La calidad del DNA obtenido se verificó mediante la integridad de las bandas, la concentración se determinó mediante la comparación de las mismas con un DNA Lambda (λ) marca Fermentas de concentración conocida (100 ng) y por dilución se llevó a la concentración requerida de 25 ng/ μ L aproximadamente.

8.4 CARACTERIZACIÓN CON MARCADORES RAPDs

Para el análisis de variabilidad genética de *C. acutatum* mediante el marcador molecular RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA (DNA Polimórfico Amplificado al Azar) se siguió el protocolo de Williams y colaboradores (1990) modificado por Lardner y colaboradores (1999).

8.4.1 Protocolo Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) reportado por Williams y colaboradores (1990) modificado por Lardner y colaboradores (1999)

La reacción de RAPDs se llevó a cabo usando nueve oligonucleótidos decámeros de secuencias al azar (Tabla 2) 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 oligonucleótidos primers se utilizaron en reacciones individuales para la amplificación de 25 aislamientos de *C. acutatum*. Sin embargo mediante este método no se obtuvo productos de amplificación o el patrón de bandas no fue significativo para ser analizado; por lo tanto se optó por evaluar 18 combinaciones de pares de primers (Tabla 3).

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos (Operon Technologies, Inc.) utilizados para determinar la variabilidad genética de 25 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. Fuente: Esta investigación

Tabla 3. Combinaciones de pares de primers RAPDs utilizadas.

CÓDIGO	COMBINACIONES DE PRIMERS	CÓDIGO	COMBINACIONES DE PRIMERS
A	OPD 01 / OPD 02	K	OPAN19 / OPAN20
B	OPD 02 / OPD 03	M	OPAN19 / OPD02
C	OPD 01 / OPD 03	N	OPAN20 / OPAD02
D	OPAN08 / OPD 01	R	OPD 01 / OPAN 19
E	OPAN08 / OPD 02	S	OPBA08 / OPAN19
F	OPAN08 / OPD 03	T	OPAN08 / OPBA08
H	OPAN08 / OPAN19	W	OPAN 08 / OPD 02
I	OPAN08 / OPAN20	X	OPAN 08 / OPD 03
J	OPAN 08 / OPD 01	Z	OPAN19 / OPD03

*Combinaciones de primers que fueron analizadas en este estudio. Fuente: Esta investigación

Se amplificó un volumen de reacción de 15 µL para cada una de las muestras, usando los reactivos, concentraciones y cantidades indicadas en la tabla 4, para cada oligonucleótido se preparó una mezcla con todos los reactivos (excepto el DNA) 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 5 μL de DNA [$\approx 25 \text{ ng}/\mu\text{L}$]. 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 consistieron en la desnaturalización inicial a 95°C por 5 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 7 minutos para asegurar la extensión completa de los productos. En cada reacción se montó un control positivo para *C. acutatum* (V064), un control alternativo correspondiente a *C. gloeosporioides* (V016) y un control negativo de reacción (sin muestra de DNA) para registrar posibles agentes contaminantes que pudieran indicar falsos positivos.

Tabla 4. Reactivos, concentraciones y cantidades utilizadas para la amplificación de muestras de DNA mediante la técnica RAPDs.

Reactivos	Concentración Final	Cantidad primer (μL)	Cantidad 2 primers (μL)
Go Taq™ Reaction Buffer 10 X (M3005 de 500 u)	1 X	3	3
dNTPs	0.4 mM	2.4	2.4
MgCl ₂	3 mM	0.9	0.9
1 Primer	1 μM	0.75	0.75
2 Primer	1 μM	-	0.75
Taq DNA Polimerasa (recombinant) x 500units	1 U	0.18	0.18
DNA genómico de <i>C. acutatum</i>	$\approx 25 \text{ ng}$	5	5
Agua estéril libre de nucleasas	-	2.77	2.02
Volumen final		15 μL	15 μL

Fuente: Esta investigación

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 3 μL 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 8 μL de GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (100-3000bp) marca Fermentas el cual permitió dimensionar y cuantificar de manera aproximada los productos amplificados, en los 25 pozos siguientes se sembró 8 μL de cada muestra amplificada y en los tres últimos pozos se montó 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.

8.5 ANÁLISIS DE DATOS

El perfil de bandas producido con cada una de las combinaciones fueron transferidas a medio magnético para su análisis. Inicialmente se optó por utilizar GelQuest - DNA Fingerprint Analysis Software (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany) para analizar los perfiles de DNA y los patrones de los fragmentos, sin embargo la nitidez y el contraste de las imágenes generó ruidos que no permitieron la correcta detección de los fragmentos amplificados. Por ello, los perfiles se analizaron mediante observación directa y lageneración de una cuadrícula sobre la imagen a partir de los tamaños del marcador de peso molecular utilizando la aplicación informática CoreIDRAWX5.

Las bandas fueron numeradas en relación con su migración en orden ascendente a partir de la de mayor tamaño molecular. Se realizó un Análisis de Clúster por combinación 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 a la ausencia de la misma, 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 seis dendrogramas (uno por combinación) 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 25 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, se calculó mediante el software integrado para el análisis de datos de Genética de

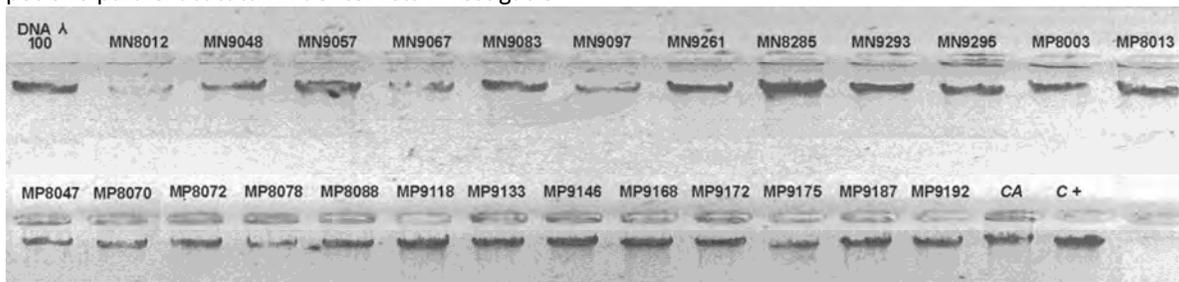
Poblaciones ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer, 2010), se verificó la posible diferencia estadística entre las poblaciones de Nariño y Putumayo mediante el estadístico F_{TS} .

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. EXTRACCIÓN DE DNA Y ANÁLISIS RAPDs DE *Colletotrichum acutatum*

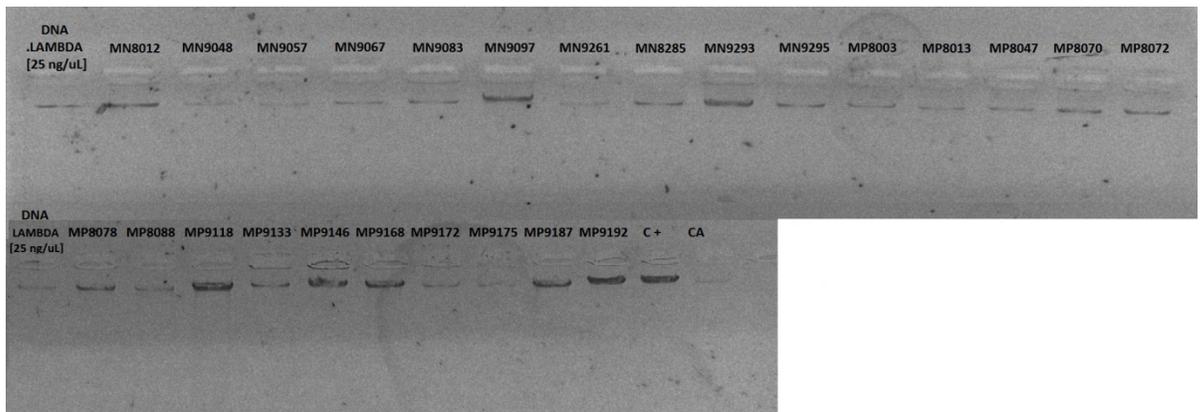
Para la optimización de la extracción de DNA de los diferentes aislamientos de *Colletotrichum acutatum* se utilizó el protocolo de extracción directo de Griffith y Shaw (1998) con algunas modificaciones las cuales permitieron mantener la integridad y calidad del DNA a una concentración aproximada de 100 ng/ μ L para la mayoría de las muestras (Figura5).

Figura 5. DNA de los 25 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* y los controles, mediante el protocolo de extracción directo de Griffith y Shaw (1998) modificado. CA: Control alternativo(*C. gloeosporioides*), C+: Control positivo para *C. acutatum*. Fuente: Esta investigación



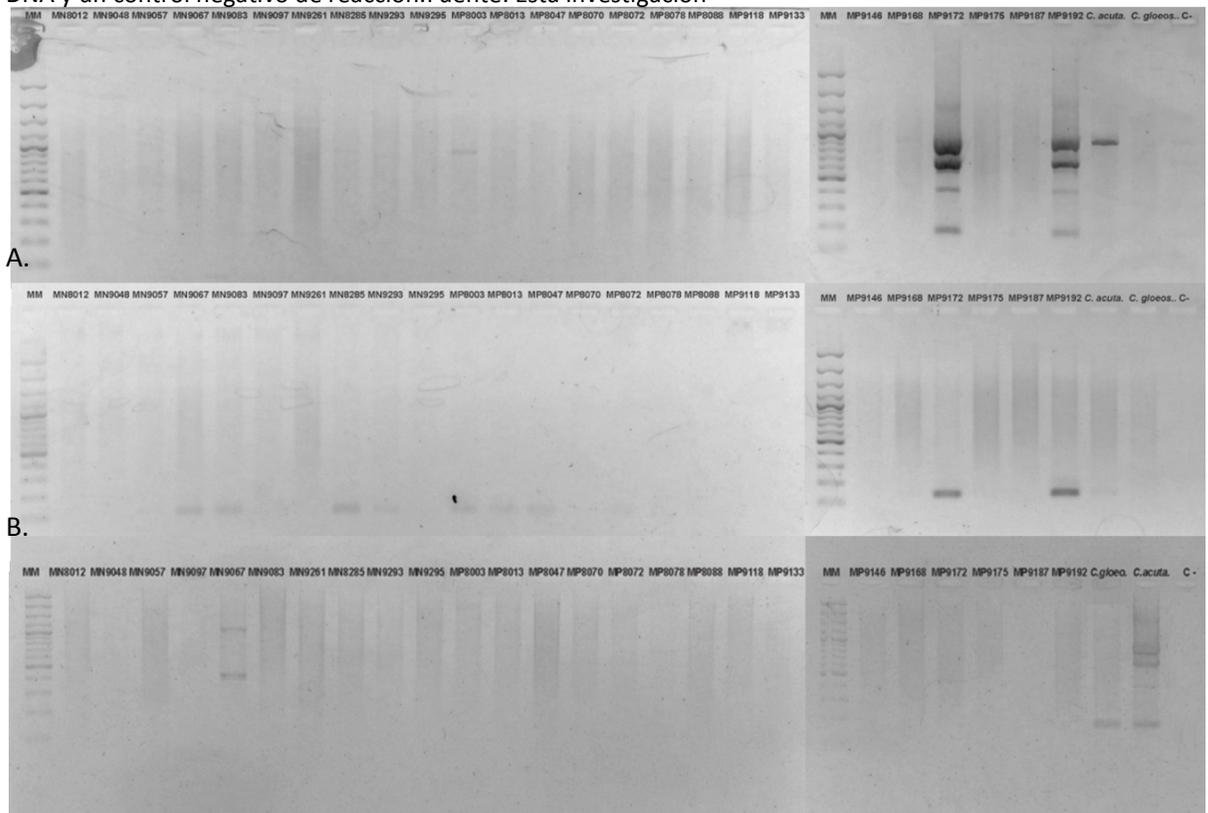
Para la obtención de perfiles claros con el marcador molecular RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) la concentración de DNase mantuvo a 25 ng/ μ Laproximadamente, para cada una de las muestras, la amplificación de DNA genómico en RAPD por debajo o por encima de esta concentraciónno es reproducible, genera ciertas"manchas" en bajasconcentraciones y la resolución es pobre o la amplificación puede ser inhibida si es alta(Williams *et al.*, 1990; Bardakci, 2001). Por esta razón se diluyó el DNA extraído agregando la cantidad necesaria de agua estéril libre de nucleasas (Figura6), la concentración de cada muestra se determinó mediante la comparación de las bandas con un DNA Lambda (λ) de concentración conocida (25 ng/ μ L).

Figura 6. DNA diluido de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* y controles. CA: Control alternativo(*C. gloeosporioides*), C+: Control positivo para *C. acutatum*. Fuente: Esta investigación

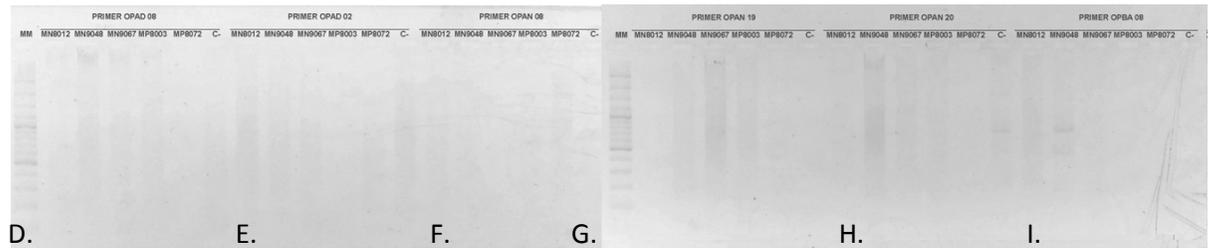


Veinticinco aislamientos de *Colletotrichum acutatum* se evaluaron mediante RAPDs empleando nueve primers decámeros de secuencias al azar siguiendo el protocolo de Williams y colaboradores (1990) modificado por Lardner y colaboradores (1999). Mediante el empleo de primers individuales no se obtuvo productos de amplificación o el patrón de bandas no fue lo suficientemente significativo para ser analizado (Figura 7), por lo tanto se optó por realizar combinaciones de pares de primers. Por este método, se utilizaron 18 combinaciones (Anexo 2) de las cuales se escogieron por su alto contenido de información polimórfica observada en los diferentes patrones de bandas (Tabla 5).

Figura 7. DNA amplificado de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs utilizando los primers individuales A. OPD 01, B. OPD 02, C. OPD 03 (con los que se amplificó los 25 aislamientos de *C. acutatum*); para los primers D. OPAD-08, E. OPAD-02, F. OPAN-08, G. OPAN-19, H. OPAN-20 e I. OPBA-08 se utilizó cinco muestras de DNA y un control negativo de reacción. Fuente: Esta investigación



C.



En general, los fingerprints obtenidos de *C. acutatum* con las seis combinaciones seleccionadas (A: OPD01 / OPD02, B: OPD02 / OPD03, H: OPAN08 / OPAN19, J: OPAN08 / OPD01, M: OPAN19 / OPD02 y Z: OPAN19 / OPD03) presentaron diferencias entre los aislamientos de estudio y los controles, amplificándose 48 fragmentos para los aislamientos de Nariño y 87 para los de Putumayo, en total 96 fragmentos diferentes fueron generados mediante RAPDs para las 25 cepas de estudio (Tabla 6).

Tabla 5. Número de loci generados con cada combinación de par de primers mediante RAPDs.

COMBINACIÓN	PAR DE PRIMERS	CANTIDAD DE LOCI OBSERVADOS		
		NARIÑO	PUTUMAYO	TOTAL AISLAMIENTOS
A	OPD 01 / OPD 02*	5	13	13
B	OPD 02 / OPD 03*	8	18	20
C	OPD 01 / OPD 03	2	3	3
D	OPAN08 / OPD 01	NA	NA	--
E	OPAN08 / OPD 02	NA	NA	--
F	OPAN08 / OPD 03	NA	NA	--
H	OPAN08 / OPAN19*	5	6	9
I	OPAN08 / OPAN20	NA	NA	--
J	OPAN 08 / OPD 01*	4	9	9
K	OPAN19 / OPAN20	NA	NA	--
M	OPAN19 / OPD02*	9	15	16
N	OPAN20 / OPAD02	NA	NA	--
R	OPD 01 / OPAN 19	3	4	7
S	OPBA08 / OPAN19	NA	NA	--
T	OPAN08 / OPBA08	NA	NA	--
W	OPAN 08 / OPD 02	5	2	6
X	OPAN 08 / OPD 03	2	4	4
Z	OPAN19 / OPD03*	17	26	29

TOTAL DE BANDAS	60	100	116
-----------------	----	-----	-----

*Combinaciones de primers que fueron analizadas en este estudio.

NA: no amplifico.

Fuente: Esta investigación

El aislamiento MN8012 del municipio de Pasto (Nariño) no presentó productos de amplificación con ninguna de las 18 combinaciones por lo que no se incluye en el análisis. Algunos de los aislamientos no presentaron productos de amplificación en diferentes combinaciones, lo cual puede ser explicado de dos maneras según Luna y colaboradores (2003): 1) el primer no encontró ninguna región homóloga con el DNA genómico de *C. acutatum* y 2) sí haya existido alguna región homóloga, pero las condiciones de amplificación 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 translocaciones, inversiones, deleciones o mutaciones.

Tabla 6. Número de loci generados con las seis combinaciones analizadas en este estudio.

COMBINACIONES ANALIZADAS	PAR DE PRIMERS	CANTIDAD DE LOCI OBSERVADOS		
		NARIÑO	PUTUMAYO	TOTAL AISLAMIENTOS
A	OPD 01 / OPD 02	5	13	13
B	OPD 02 / OPD 03	8	18	20
H	OPAN08 / OPAN19	5	6	9
J	OPAN 08 / OPD 01	4	9	9
M	OPAN19 / OPD02	9	15	16
Z	OPAN19 / OPD03	17	26	29
TOTAL DE BANDAS		48	87	96

Fuente: Esta investigación

El aislamiento MN8012 del municipio de Pasto (Nariño) no presentó productos de amplificación con ninguna de las 18 combinaciones por lo que no se incluye en el análisis. Algunos de los aislamientos no presentaron productos de amplificación en diferentes combinaciones, lo cual puede ser explicado de dos maneras según Luna y colaboradores (2003): 1) el primer no encontró ninguna región homóloga con el DNA genómico de *C. acutatum* y 2) sí haya existido alguna región homóloga, pero las condiciones de amplificación 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 translocaciones, inversiones, deleciones o mutaciones.

Para el análisis matemático 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 de mismo tamaño molecular, la intensidad de las bandas no fue considerada un factor de polimorfismo como lo sugiere Luna y colaboradores (2003). Se determinó una banda polimórfica aquella que está presente en una frecuencia mayor al 1 % y menor al 100 %, y a una banda presente en todos los patrones génicos de frecuencia del 100 % como una banda no polimórfica (Luna *et al.*, 2003).

El mayor número de fragmentos amplificados se obtuvo con la combinación Z con 17 bandas para los aislamientos de Nariño y 26 para los de Putumayo, mientras que el menor número correspondió a las combinaciones H (5 para los de Nariño - 6 para los de Putumayo) y J (4 para los de Nariño - 9 para los de Putumayo); en promedio para cada uno de los aislamientos se obtuvieron 6 fragmentos por combinación de par de primers, el tamaño molecular de los fragmentos osciló entre el rango de 100 a 3000 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 nueve aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño amplificados con la combinación A (OPD 01/OPD 02) produjeron cinco bandas (Figura 8) con un tamaño molecular aproximado de 400 a 1250 pb, con esta combinación se obtuvo una banda polimórfica con una frecuencia de 6.7% (Tabla 7) representando baja variabilidad (20%) para los aislamientos de Nariño. Los 15 aislamientos de Putumayo amplificados con la combinación A produjeron 13 bandas (Figura 8) con un tamaño molecular aproximado de 200 a 1500 pb, nueve de estas con frecuencia menor al 10% mostrando una alta presencia de bandas polimórficas (69.2%) para los aislamientos de esta región (Tabla 7). Tanto para Putumayo como para los 24 aislamientos analizados se presentó un polimorfismo del 69.2% resultado que indica una alta variabilidad entre los diferentes aislamientos de *C. acutatum*.

Figura 8. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación A: primers OPD01 / OPD02; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. C+: Control positivo para *C. acutatum*; C-: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C--: Control negativo de la reacción. Fuente: Esta investigación.



Tabla 7. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs con la combinación A (OPD01/OPD02), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$). Fuente: Esta investigación.

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)			f (%)			f (%)		
		NARIÑO			PUTUMAYO			TOTAL		
			FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	
1	1500	---	---	1.3	1.3	1.7	1.7			
2	1250	20.0	---	10.5	---	8.5	8.5			
3	1100	---	---	1.3	1.3	1.7	1.7			
4	1000	26.7	---	17.1	---	13.6	---			
5	900	6.7	6.7	7.9	7.9	8.5	8.5			
6	800	---	---	5.3	5.3	6.8	6.8			
7	700	13.3	---	15.8	---	17.0	---			
8	600	---	---	9.2	9.2	10.2	---			
9	550	---	---	4.0	4.0	5.1	5.1			
10	500	---	---	2.6	2.6	3.4	3.4			
11	400	33.3	---	18.4	---	15.3	---			
12	350	---	---	2.6	2.6	3.4	3.4			
13	200	---	---	4.0	4.0	5.1	5.1			
	TOTAL	100%		100%		100%				
		BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P
		5	1	20	13	9	69.2	13	9	69.2

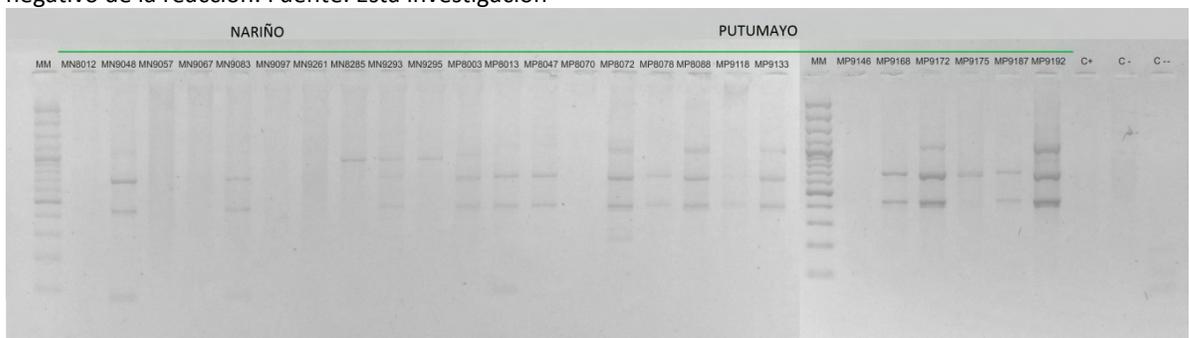
Los aislamientos de Nariño con la combinación B(OPD 02/OPD 03) produjeron 8 bandas (Figura 9) con un tamaño molecular aproximado de 400 a 1750 pb, con un total de 4 bandas de frecuencia \leq a 10% mostrando un 50% de polimorfismo para los aislamientos de esta región evidenciando la existencia de variabilidad dentro de la población. Se produjeron 18 bandas (Tabla 8) para los aislamientos del departamento de Putumayo con la combinación B con un tamaño molecular aproximado de 100 a 2000 pb, con un total de 15 bandas de frecuencia menor al 10% para un polimorfismo del 83.3%, resultado que apunta a la existencia de una elevada variabilidad en la población de Putumayo. Para las 24 cepas se evidenció un polimorfismo del 85% que muestra una elevada variabilidad intrapoblacional.

Tabla 8. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación B (OPD 02 / OPD 03), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$). Fuente: Esta investigación.

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)			f (%)			f (%)		
		NARIÑO			PUTUMAYO			TOTAL		
			FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)		FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	

1	2000	---	---	4.4	4.4	3.1	3.1			
2	1750	7.1	7.1	---	---	1.6	1.6			
3	1500	---	---	2.2	2.2	1.6	1.6			
4	1250	---	---	4.4	4.4	3.1	3.1			
5	1200	---	---	6.7	6.7	4.7	4.7			
6	1100	21.4	---	6.7	6.7	10.9	---			
7	1040	---	---	2.2	2.2	1.6	1.6			
8	1000	21.4	---	---	---	4.7	4.7			
9	850	---	---	2.2	2.2	3.1	3.1			
10	800	---	---	4.4	4.4	4.7	4.7			
11	750	7.1	7.1	11.1	---	9.4	9.4			
12	700	14.3	---	2.2	2.2	4.7	4.7			
13	680	---	---	4.4	4.4	3.1	3.1			
14	650	---	---	6.7	6.7	4.7	4.7			
15	480	7.1	7.1	15.6	---	14.1	---			
16	450	14.3	---	11.1	---	12.5	---			
17	420	---	---	6.7	6.7	4.7	4.7			
18	400	7.1	7.1	4.4	4.4	4.7	4.7			
19	380	---	---	2.2	2.2	1.6	1.6			
20	100	---	---	2.2	2.2	1.6	1.6			
TOTAL		100 %		100 %		100 %				
		BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P
		8	4	50	18	15	83,3	20	17	85

Figura 9. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación B: primers OPD02 - OPD03; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. C+: Control positivo para *C. acutatum*; C-: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C--: Control negativo de la reacción. Fuente: Esta investigación



Para los aislamientos de Nariño la combinación H (OPAN 08/OPAN 19) produjo 5 bandas en total (Figura 10) con un tamaño molecular aproximado de 750 a 1750 pb, con una banda de frecuencia \leq a 10% para un polimorfismo del 20% para los aislamientos de esta región (Tabla 9). Para Putumayo se produjeron seis bandas en total con un tamaño molecular aproximado de 500 a

3000 pb, de las cuales dos bandas (frecuencia \leq al 10%) representaron un polimorfismo del 33.3%. Se obtuvo para los 24 aislamientos un polimorfismo del 77.8% representando una alta variabilidad dentro de la población.

La combinación J (OPAN 08/OPD 01) produjo 4 bandas (Figura 11) para los aislamientos de Nariño con un tamaño molecular aproximado de 400 a 1600 pb, con 2 bandas de frecuencia \leq al 10% combinación en la que se obtuvo un polimorfismo del 50% (Tabla 10). Para los aislamientos de Putumayo se produjeron 9 bandas de un tamaño molecular aproximado de 400 a 2700 pb, con un total de 6 bandas de frecuencia menor al 10% y polimorfismo del 66.7% con esta combinación. Para los 24 aislamientos se obtuvo un polimorfismo del 66.7% lo que muestra variabilidad dentro de la población.

Figura 10. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación H: primers OPAN 08 / OPAN 19; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. C+: Control positivo para *C. acutatum*; C-: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C--: Control negativo de la reacción. Fuente: Esta investigación

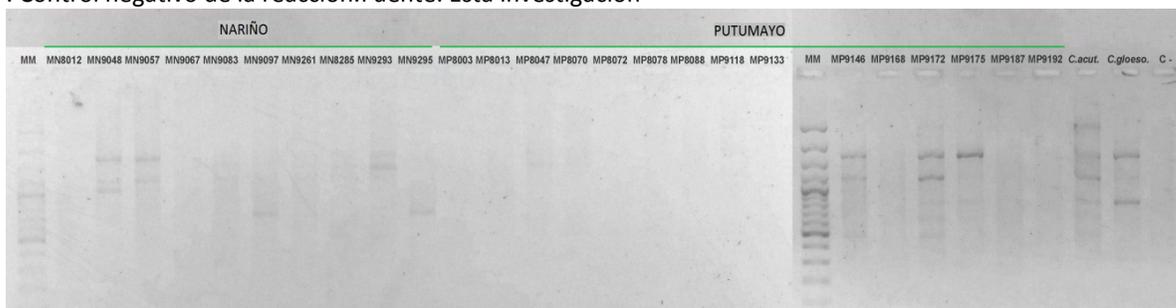


Tabla 9. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación H (OPAN 08 / OPAN 19), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$). Fuente: Esta investigación.

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	NARIÑO		PUTUMAYO		TOTAL	
		f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)
1	3000	---	---	8.3	8.3	4.6	4.6
2	1750	30	---	25.0	---	27.3	---
3	1400	10	10	---	---	4.6	4.6
4	1200	20	---	25.0	---	22.7	---
5	1050	20	---	---	---	9.1	9.1
6	800	---	---	16.7	---	9.1	9.1
7	750	20	---	---	---	9.1	9.1

8	600	---	---	8.3	8.3	4.6	4.6
9	500	---	---	16.7	---	9.1	9.1
TOTAL		100 %		100 %		100 %	
		BT	BP	% P	BT	BP	% P
		5	1	20	6	2	33.3
		9	7	77.8			

Figura 11. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación J: primers OPAN08 - OPD01; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. C+: Control positivo para *C. acutatum*; C-: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C--: Control negativo de la reacción. Fuente: Esta investigación.



Tabla 10. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación J (OPAN 08 / OPD 01), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$). Fuente: Esta investigación.

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	NARIÑO		PUTUMAYO		TOTAL	
		f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)
1	2700	---	---	6.3	6.3	3.7	3.7
2	2050	---	---	6.3	6.3	3.7	3.7
3	2000	---	---	6.3	6.3	3.7	3.7
4	1600	9.1	9.1	6.3	6.3	7.4	7.4
5	1450	---	---	6.3	6.3	3.7	3.7
6	1100	36.4	---	25.0	---	29.6	---
7	650	---	---	6.3	6.3	3.7	3.7
8	420	45.5	---	25.0	---	33.3	---
9	400	9.1	9.1	12.5	---	11.1	---
TOTAL		100 %		100 %		100 %	

	BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P
	4	2	50	9	6	66.7	9	6	66.7

La combinación M (OPAN 19/OPD 02) generó para los aislamientos de Nariño 9 bandas (Figura 12) con un tamaño molecular de 680 a 2000 pb de las cuales se obtuvo 6 bandas de frecuencia $\leq 10\%$ con esta combinación, para un polimorfismo del 66.7%. La combinación M produjo 15 bandas para los aislamientos de Putumayo de tamaño aproximado entre 680 y 2000 pb, de las cuales 13 (frecuencias $\leq 10\%$) aportaron un polimorfismo del 86.7%. Para los aislamientos analizados en general se obtuvo un polimorfismo del 87.5% revelándose una elevada variabilidad dentro de la población.

Figura 12. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs, utilizando la combinación M (OPAN19 / OPD02); MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. C+: Control positivo para *C. acutatum*; C-: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C-: Control negativo de la reacción. Fuente: Esta investigación.



Tabla 11. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación M (OPAN 19 / OPD 02), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$). Fuente: Esta investigación.

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)
		NARIÑO		PUTUMAYO		TOTAL	
1	2000	4.6	4.6	2.4	2.4	3.2	3.2
2	1480	4.6	4.6	2.4	2.4	3.2	3.2
3	1400	---	---	2.4	2.4	1.6	1.6
4	1280	9.1	9.1	---	---	3.2	3.2
5	1250	9.1	9.1	9.8	9.8	9.5	9.5
6	1220	4.6	4.6	2.4	2.4	3.2	3.2
7	1200	---	---	7.3	7.3	4.8	4.8
8	1000	4.6	4.6	7.3	7.3	6.4	6.4
9	980	---	---	2.4	2.4	1.6	1.6

10	950	13.6	---	7.3	7.3	9.5	9.5
11	900	22.7	---	14.6	---	17.5	---
12	870	---	---	4.9	4.9	3.2	3.2
13	850	---	---	14.6	4.4	9.5	9.5
14	820	---	---	2.4	2.4	1.6	1.6
15	680	27.3	---	7.3	7.3	14.3	---
16	600	---	---	12.2	---	7.9	7.9
	TOTAL	100 %		100 %		100 %	
		BT	BP	% P	BT	BP	% P
		9	6	66.67	15	13	86.67
		BT	BP	% P	BT	BP	% P
		16	14	87.50			

Con la combinación Z (OPAN 19/OPD 03) se generaron 17 bandas (Figura 13) para los aislamientos de Nariño con un tamaño molecular aproximado de 150 a 2100 pb, y un total de 13 bandas de frecuencia menor al 10% obteniéndose el mayor porcentaje de polimorfismo (76.5%) con esta combinación para Nariño. La combinación Z produjo 26 bandas (Tabla 12) para Putumayo con un tamaño molecular aproximado de 150 a 2500 pb para un total de 24 bandas con frecuencias menores al 10%, se obtuvo un porcentaje de polimorfismo del 92.3%. Con esta combinación se evidenció una diferencia altamente significativa dentro de los diferentes aislamientos de *C. acutatum* tanto para Nariño como Putumayo con un polimorfismo del 93.1%.

Figura 13. Patrón de bandas obtenidas para los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante RAPDs utilizando la combinación Z: OPAN 19 / OPD 03; MM: DNA Ladder de 100 pb (100-3000bp) marca Fermentas. C+: Control positivo para *C. acutatum*; C-: Control alterno (*C. gloeosporioides*); C--: Control negativo de la reacción. Fuente: Esta investigación.

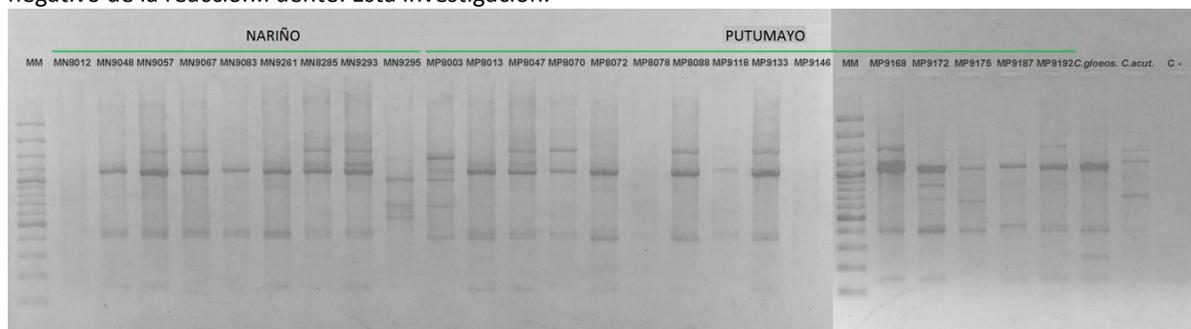


Tabla 12. Frecuencias de bandas polimórficas obtenidas de los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando la combinación Z (OPAN 19 / OPD 03), f: frecuencia, BT: bandas totales; BP: bandas que indican polimorfismo; % P: porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{BT} \times 100$). Fuente: Esta investigación.

N° FRAGMENTO	TAMAÑO APROXIMADO DEL FRAGMENTO (pb)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)	f (%)	FRECUENCIA FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (%)

		NARIÑO			PUTUMAYO			TOTAL		
1	2500	---	---		1.2	1.2		0.8	0.8	
2	2100	3.9	3.9		1.2	1.2		2.2	2.2	
3	2000	3.9	3.9		2.4	2.4		3.0	3.0	
4	1750	---	---		1.2	1.2		0.8	0.8	
5	1600	3.9	3.9		9.8	9.8		7.5	7.5	
6	1550	---	---		1.2	1.2		0.8	0.8	
7	1500	---	---		1.2	1.2		0.8	0.8	
8	1400	1.9	1.9		2.4	2.4		2.2	2.2	
9	1300	5.8	5.8		4.9	4.9		5.2	5.2	
10	1200	3.9	3.9		1.2	1.2		2.2	2.2	
11	1180	3.9	3.9		4.9	4.9		4.5	4.5	
12	1150	11.5	---		6.1	6.1		8.2	8.2	
13	1100	3.9	3.9		4.9	4.9		4.5	4.5	
14	1050	---	---		2.4	2.4		1.5	1.5	
15	1020	1.9	1.9		---	---		0.8	0.8	
16	1000	---	---		1.2	1.2		0.8	0.8	
17	900	---	---		2.4	2.4		1.5	1.5	
18	880	---	---		3.7	3.7		2.2	2.2	
19	850	13.5	---		4.9	4.9		8.2	8.2	
20	780	---	---		1.2	1.2		0.8	0.8	
21	720	---	---		1.2	1.2		0.8	0.8	
22	680	1.9	1.9		2.4	2.4		2.2	2.2	
23	660	---	---		2.4	2.4		1.5	1.5	
24	620	1.9	1.9		---	---		0.8	0.8	
25	550	1.9	1.9		---	---		0.8	0.8	
26	480	---	---		1.2	1.2		0.8	0.8	
27	440	13.5	---		12.2	---		12.7	---	
28	420	13.5	---		12.2	---		12.7	---	
29	150	9.6	9.6		9.8	9.8		9.7	9.7	
TOTAL		100 %			100 %			100 %		
		BT	BP	% P	BT	BP	% P	BT	BP	% P
		17	13	76.5	26	24	92.3	29	27	93.1

Se produjo mayor información con las combinaciones de primers A: OPD 01 / OPD 02, B: OPD 02 / OPD 03, M: OPAN 19 / OPD 02 y Z: OPAN 19 / OPD 03 que se caracterizan por su variación de contenido de CG entre 60 y 70 %. La población de Nariño presentó un alto porcentaje de polimorfismo (56.3) mostrando una alta variabilidad dentro de la misma (Tabla 13), la población de Putumayo presentó un porcentaje superior de polimorfismo (79.3) mostrando una elevada variabilidad intrapoblacional. Los resultados obtenidos para los 24 aislamientos de C.

acutatum evidencian un elevado porcentaje de polimorfismo (83.3) y la heterogeneidad observada en los perfiles genéticos indican una alta variabilidad dentro de las poblaciones analizadas. A pesar de presentarse un mayor número de bandas poco frecuentes y un mayor porcentaje de polimorfismo (en todas las combinaciones empleadas) en los aislamientos del departamento de Putumayo, ambas poblaciones de estudio no se diferenciaron, el comportamiento de los datos sugirió que ambas son semejantes, en cuanto todos los aislamientos presentaron alta variabilidad genética, sin la presencia de aislamientos clonales.

Los departamentos de Nariño y Putumayo (Alto Putumayo) presentan una gran variedad de formaciones geográficas naturales y por ende una alta diversidad climática en los que se desarrolla una multiplicidad de formaciones vegetales; las condiciones geoclimáticas como la radiación solar, la lluvia, la temperatura, la humedad, los vientos, entre otros, determinan el clima y los diferentes organismos se establecen en las zonas más propicias para su desarrollo. No obstante, especies como las del género *Colletotrichum* que poseen una alta capacidad de adaptación gracias a la amplia variabilidad morfológica, fisiológica, y patogénica, les ha permitido adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a tener una amplia distribución geográfica (Negrete & Redondo, 1997; Oliveira *et al.*, 2005; Tozze *et al.*, 2006; Saldarriaga *et al.*, 2008) aumentando la proliferación de estos fitopatógenos en ambas regiones; tanto las condiciones climáticas como la variabilidad de los hospederos podrían estar influyendo en la capacidad de estos hongos para adaptarse.

Las diferencias a nivel de DNA observadas entre los aislamientos puedan deberse a cambios de nucleótidos que impiden la amplificación por el cambio de la secuencia en el sitio de unión del iniciador, por deleción del sitio de unión, por inserciones que aumentan demasiado la distancia entre los sitios de unión de los iniciadores para permitir su amplificación e inserciones o deleciones que cambian el tamaño del fragmento amplificado, estos cambios en el DNA podrían estar relacionados con una alta tasa de mutación del patógeno, de allí la importancia de la utilización de los marcadores RAPDs debido al uso de oligonucleótidos de secuencias al azar.

Tabla 13. Porcentaje de polimorfismo ($\frac{BP}{RT} \times 100$) para los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño y Putumayo mediante RAPDs utilizando las diferentes combinaciones. Fuente: Esta investigación.

COMBINACIÓN	% P NARIÑO	% P PUTUMAYO	% P TOTAL
A: OPD 01 / OPD 02	20	69.2	69.2
B: OPD 02 / OPD 03	50	83.3	85.0
H: OPAN 08 / OPAN 19	20	33.3	77.8
J: OPAN 08 / OPD 01	50	66.7	66.7
M: OPAN 19 / OPD 02	66.7	86.7	87.5
Z: OPAN 19 / OPD 03	76.5	92.3	93.1

TOTAL	56.3	79.3	83.3
-------	------	------	------

9.1.1. Distancia genética para los aislamientos de *C. acutatum* procedentes de Nariño

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*. Así, tras la obtención de varios dendrogramas con agrupaciones parecidas, se eligió el que presentó el coeficiente cofenético más elevado (coeficiente de Jaccard) debido a que representa con mayor exactitud las relaciones originales existentes entre los elementos en estudio (Gupta *et al.*, 2010; Sangdee *et al.*, 2011).

A partir de la matriz de similitud generada de cada combinación se produjo un dendrograma, el análisis de clusters ó de conglomerados ordenó los aislamientos en grupos, de forma que el grado de asociación/similitud entre los miembros del mismo cluster fuera más fuerte que el grado de asociación/similitud entre miembros de diferentes clusters; en los dendrogramas generados no se observan todos los aislamientos analizados únicamente los que presentaron al menos una banda por lo que el coeficiente de Jaccard no incluyelosaislamientos no amplificados.

El dendrograma obtenido del análisis de DNA con la combinación A para las poblaciones de Nariño mostró una correlación cofenética del 78,3% generándose dos grupos principales (Figura 14). La cercanía genética más estrecha (66,7%) fue entre los aislamientos MN9083 (Buesaco) y MN9293 (Córdoba) y entre los aislamientos MN9285 y MN9295 procedentes deCórdoba .La mayor distancia genética se presentó para el aislamiento MN9048 perteneciente a Buesaco siendo el último en incorporarse al cluster.

En el dendrograma generado con la combinación B de correlación cofenética de 93.48% se observa la formación de dos grupos principales separados por ubicación geográfica (Figura 15). El primer grupo conformado por los aislamientos de Buesaco MN9048 y MN9057 con un grado de asociación del 75% y el segundo grupo formado por los aislamientos de Córdoba MN9283, MN9285 y MN9295 estos dos últimos con una similitud del 50%.

Figura 14. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño mediante RAPDs la combinación A: OPD01/OPD02. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.Fuente: Esta investigación.

VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE
Colletotrichum acutatum

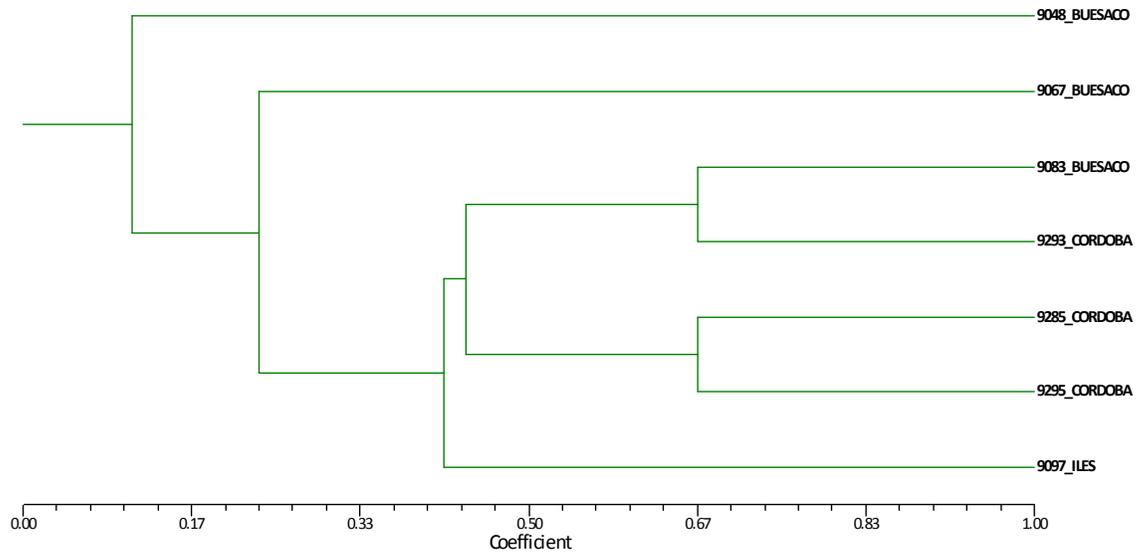
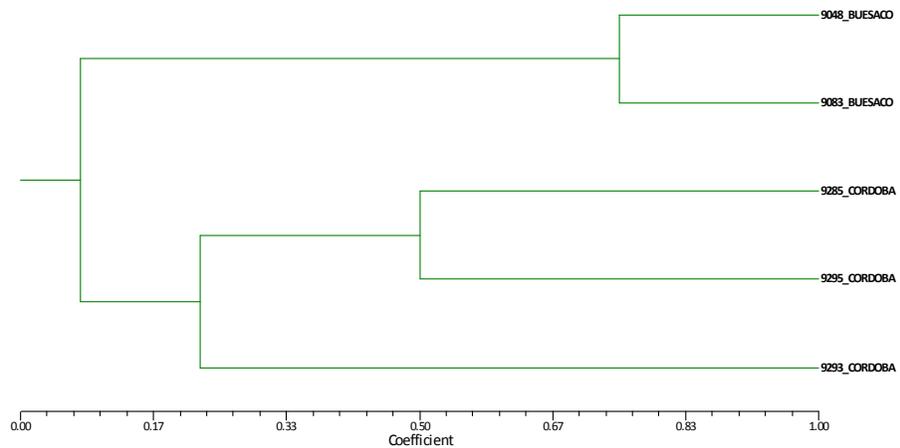


Figura 15. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño mediante RAPDs con cada la combinación B: OPD02/OPD03. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard. Fuente: Esta investigación.

VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE
Colletotrichum acutatum



Mediante la combinación H se produjo un dendrograma con una correlación cofenética de 97.1%, lográndose distinguir dos grupos principales (Figura 16). En el primer grupo se encontró la cercanía genética más estrecha entre los aislamientos de Buesaco MN9048 y MP9057 con un grado de similitud del 100%, la mayor distancia se presentó con el grupo conformado por MN9293

(Córdoba) y MN9097 (Iles) este grupo es el último en incorporarse con un grado de similitud del 33,3%.

Figura 16. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño mediante RAPDs con la combinación H: OPAN08/OPAN19. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard. Fuente: Esta investigación.

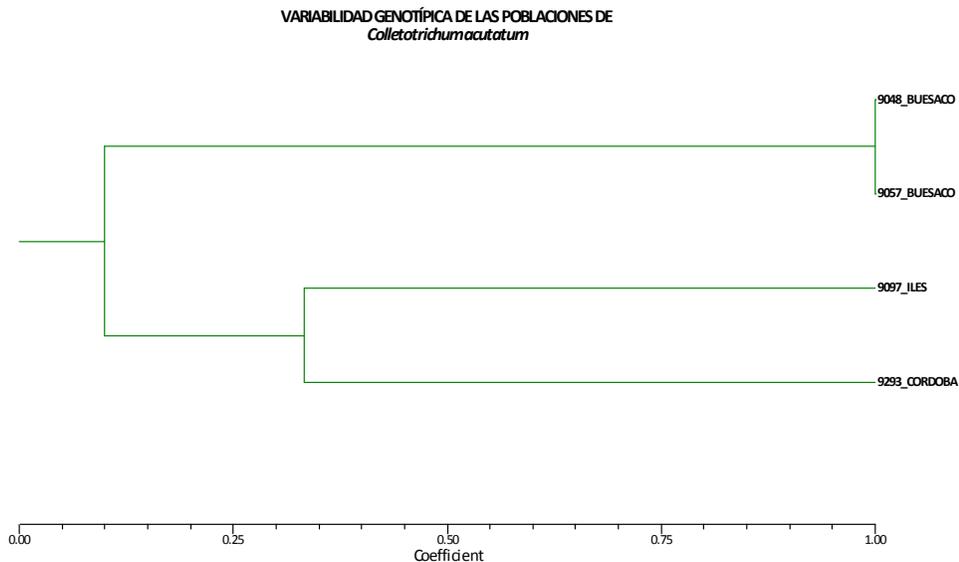
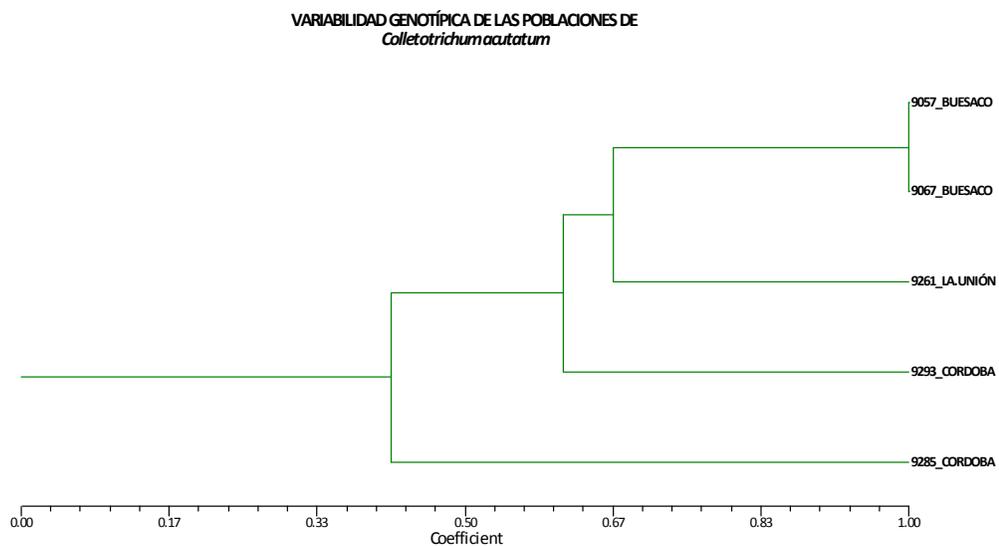


Figura 17. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño mediante RAPDs con la combinación J: OPAN08/OPD01. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard. Fuente: Esta investigación.



El dendrograma generado utilizando la combinación J con una correlación cofenética de 93.1% se logran distinguir dos grupos principales (Figura 17). La cercanía genética más estrecha fue entre los aislamientos de Buesaco MN9067 y MN9057 con un grado de asociación o semejanza del

100%, la mayor distancia se presentó con el aislamiento MN9285 perteneciente a Córdoba el último en incorporarse al cluster. La combinación M generó un dendrograma (95,2%) con dos grupos principales (Figura 18). El primero conformado por los dos aislamientos de Buesaco MN9048 y MP9067 con un grado de asociación del 50%, en el segundo grupo la distancia genética más estrecha fue entre los aislamientos MN9285 y MN9293 ambos pertenecientes a Córdoba con un grado de similitud del 100%, al igual que los aislamientos MN9083 (Buesaco) y MN9261 (La Unión) el último aislamiento en incorporarse al cluster fue MN9057 perteneciente a Buesaco.

El dendrograma generado con la combinación Z presentó una correlación cofenética de 98,2% lográndose distinguir dos grupos principales (Figura 19), en el primer grupo se reúne la mayoría de los aislamientos de Nariño, la cercanía genética más estrecha fue entre los aislamientos de Córdoba MN9285 y MN9293 con un grado de similitud del 100%, seguido de los aislamientos MN9048 (Buesaco) y MN9261 (La Unión) con 83,3% de asociación. El segundo grupo formado por el aislamiento MN9097 de Iles último en incorporarse al cluster que genéticamente presentó características completamente diferentes al resto.

Figura 18. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño mediante RAPD con la combinación M: OPAN19/OPD02. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard. Fuente: Esta investigación.

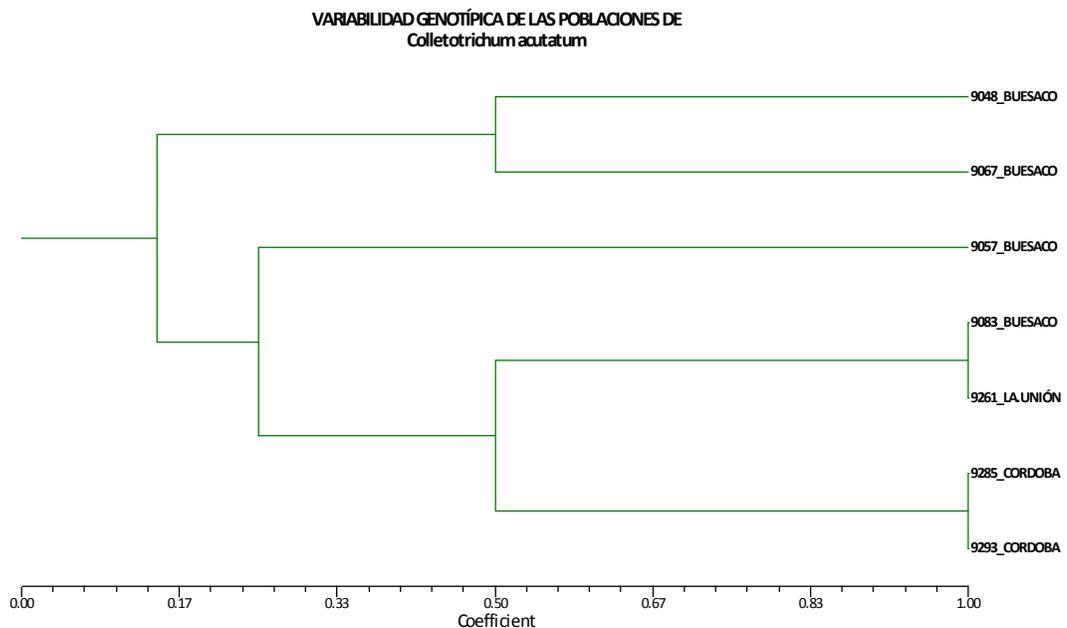
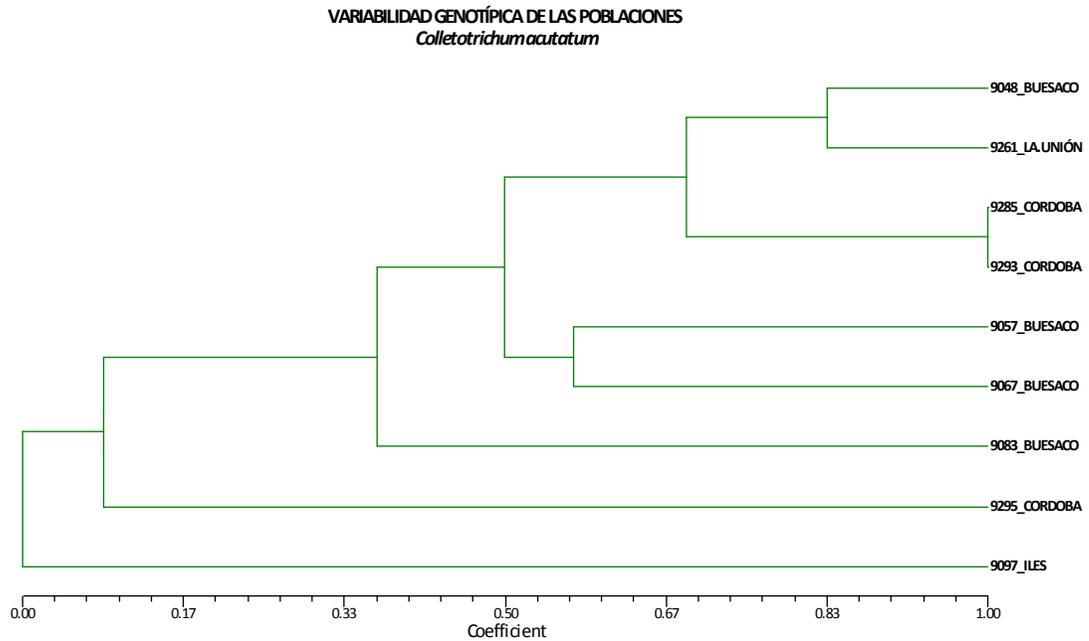
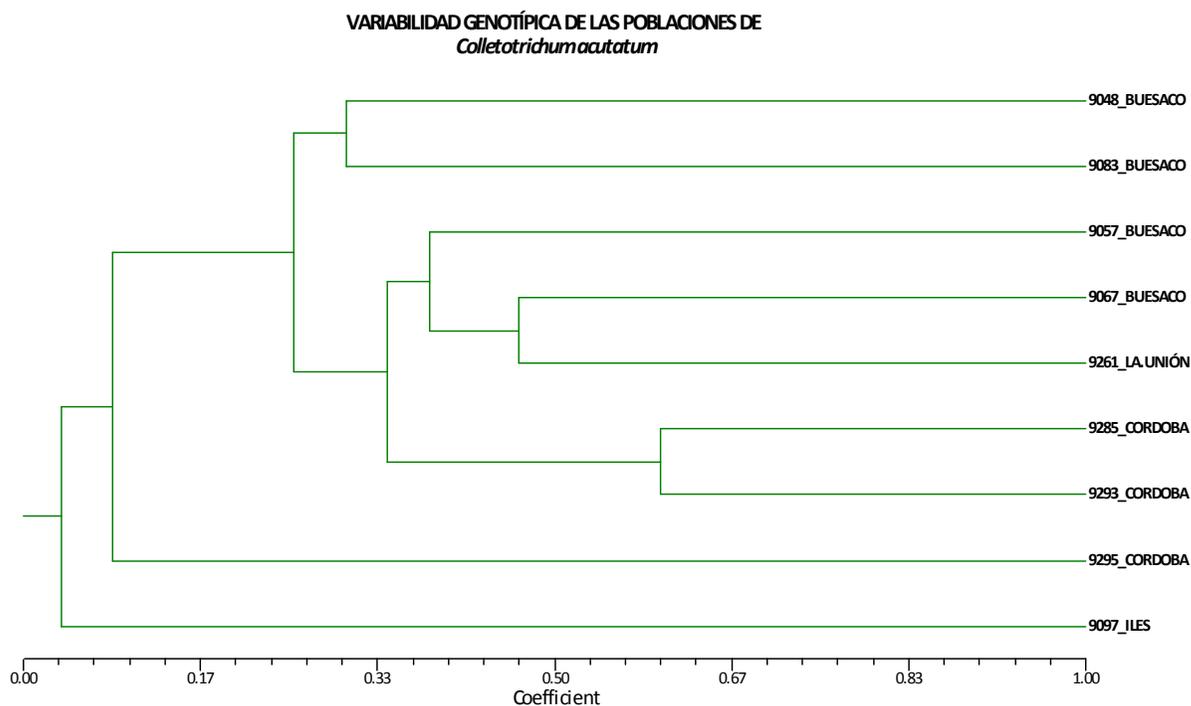


Figura 19. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño mediante RAPDs con la combinación Z: OPAN19/OPD03. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.



En el dendrograma consenso generado por la unión de los datos proporcionados por las diferentes combinaciones para los nueve aislamientos de *C. acutatum* procedentes de Nariño se muestra la formación de dos grupos principales (Figura 15), el primer grupo formado por el aislamiento MN9097 de Iles que genéticamente presentó caracteres completamente diferentes al resto siendo el último en incorporarse al cluster. El segundo grupo dividido en dos subgrupos, el primero formado por el aislamiento MN9295 de Córdoba el más distante genéticamente y el segundo grupo a su vez conformado por dos subgrupos, el primero compuesto por los aislamientos de Buesaco MN9048 y MN9083 con un grado de asociación del 30,4%; y el segundo formado por dos subgrupos más en el que se observa una asociación de los aislamientos MN9285 y MN9293 de Córdoba con un 60% de similitud. En general, los conglomerados resultantes muestran un bajo grado de homogeneidad interna y un alto grado de heterogeneidad externa para los aislamientos de *Colletotrichum acutatum*, lo que sugiere una alta variabilidad genotípica dentro de la población, se encontró algunas asociaciones de acuerdo al lugar de procedencia, sin embargo este carácter solo se presentó en algunos aislamientos.

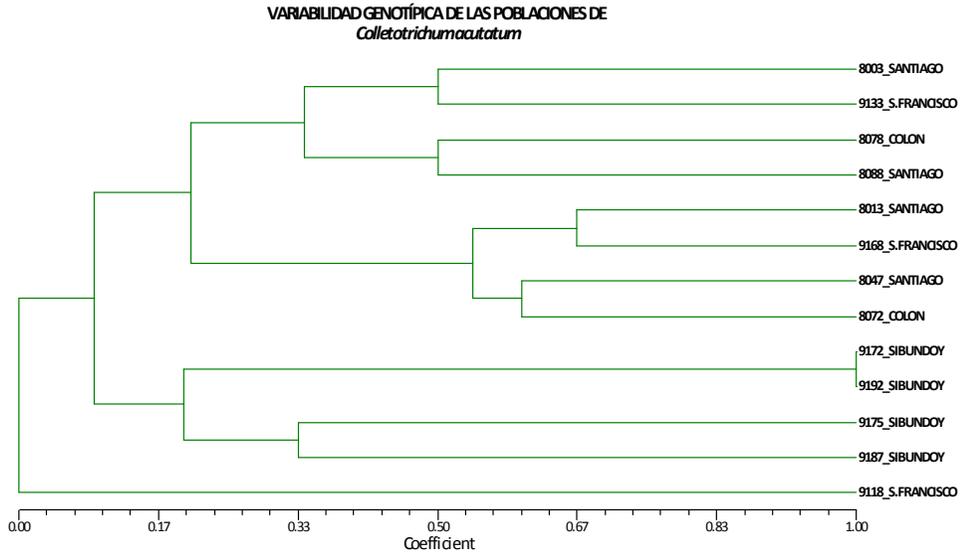
Figura 20. Distribución de los nueve aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Nariño mediante RAPDs en función de sus patrones génicos. Dendrograma consenso construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard, con un valor $r = 0.95215$. Fuente: Esta investigación.



9.1.2. Distancia genética para los aislamientos de *C. acutatum* procedentes de Putumayo

En el dendrograma obtenido del análisis RAPD con la combinación A (OPD01/OPD02) para los aislamientos de Putumayo se distinguieron dos grupos principales con una correlación cofenética del 90,8% (Figura 21). El primero formado por dos subdivisiones, en la primera se reúnen todos los aislados de Sibundoy, en donde la cercanía genética más estrecha fue entre los aislamientos MP9172 y MP9192 con un grado de similitud del 100%. En el segundo subgrupo que a su vez se subdivide en dos más, los aislamientos MP8003 (Santiago) con MP9133 (San Francisco) y MP8078 (Colón) con MP8088 (Santiago) forman un conglomerado ambos con un grado de similitud del 50%; en el segundo subgrupo los aislamientos MP8013 (Santiago) y MP9168 (San Francisco) presentaron un grado de similitud del 66,7%. La mayor distancia genética se presentó para el aislamiento MP9118 perteneciente a San Francisco siendo el último en incorporarse al cluster. Exceptuando los aislamientos con un grado de similitud del 100 y 66,7 % los demás presentan características completamente diferentes.

Figura 21. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Putumayo mediante RAPD con la combinación A: OPD01/OPD02. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard. Fuente: Esta investigación.



Con la combinación B (OPD02/OPD03) se generó un dendrograma con dos grupos principales (Figura22) y correlación cofenética del 95,3%. La menor distancia genética se presentó para los aislamientos MP8088 (Santiago) y MP9133 (San Francisco) con un grado de similitud del 80%, al igual que los aislamientos de Santiago MP8013 y MP8047. La combinación H (OPAN 08/OPAN 19) produjo un cluster con tres aislamientos (MP9146, MP9172 y MP9175) procedentes de Sibundoy agrupándose con un grado de similitud del 50% (Figura23).

Figura 22. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Putumayo medianteRAPDscn con la combinación B: OPD02/OPD03. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard.Fuente: Esta investigación.

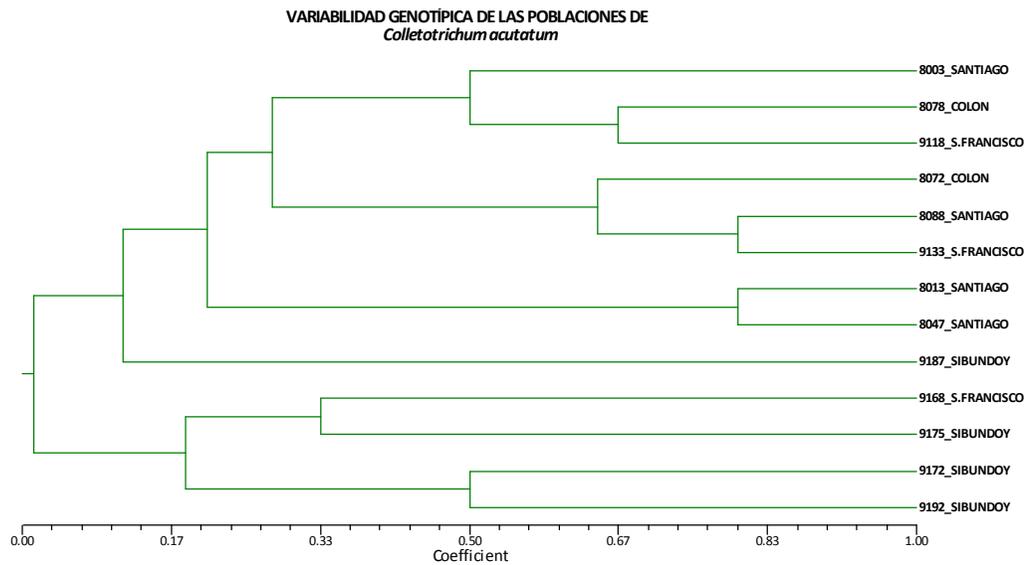
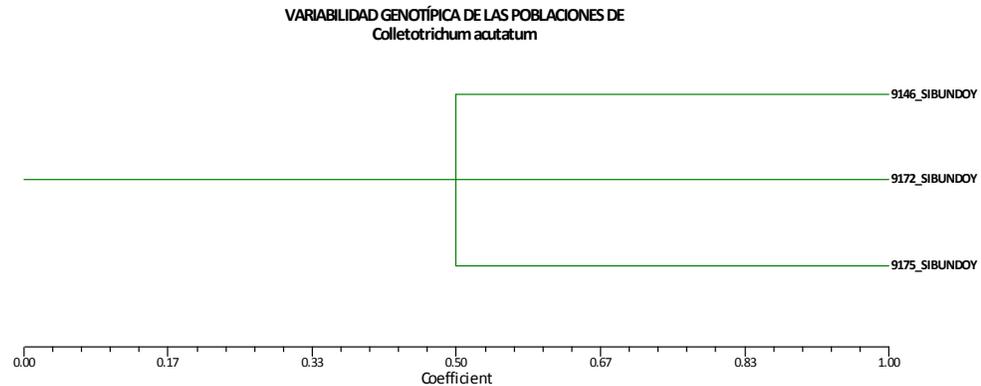


Figura 23. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Putumayo mediante RAPDs con la combinación H: OPAN08/OPAN19. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard. Fuente: Esta investigación.



El dendrograma obtenido utilizando la combinación J (OPAN08 / OPD01) muestra dos grupos definidos con una correlación co-fenética de 93.1% (Figura 24). En el primer grupo la cercanía genética más estrecha fue entre los aislamientos MP8013 (Santiago) y MP9118 (San Francisco) con un grado de similitud del 75%; el segundo grupo formado por el aislamiento MP9168 el que presentó la mayor distancia perteneciente a San Francisco siendo el último en incorporarse al cluster. La combinación M (OPAN19 / OPD02) generó un dendrograma (98,2%) con dos grupos principales (Figura 24). En el primero se reúne la mayoría de los aislamientos en donde se destacan tres grupos con una distancia genética estrecha (MP8088/MP9118; MP9172/MP9187; MP8047/MP8070/MP9175) y un grado de similitud del 100%. En el segundo grupo se ubica el aislamiento MP9146 de Sibundoy último en incorporarse al cluster.

Figura 24. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Putumayo mediante RAPDs con la combinación J: OPAN08/OPD01. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard. Fuente: Esta investigación.

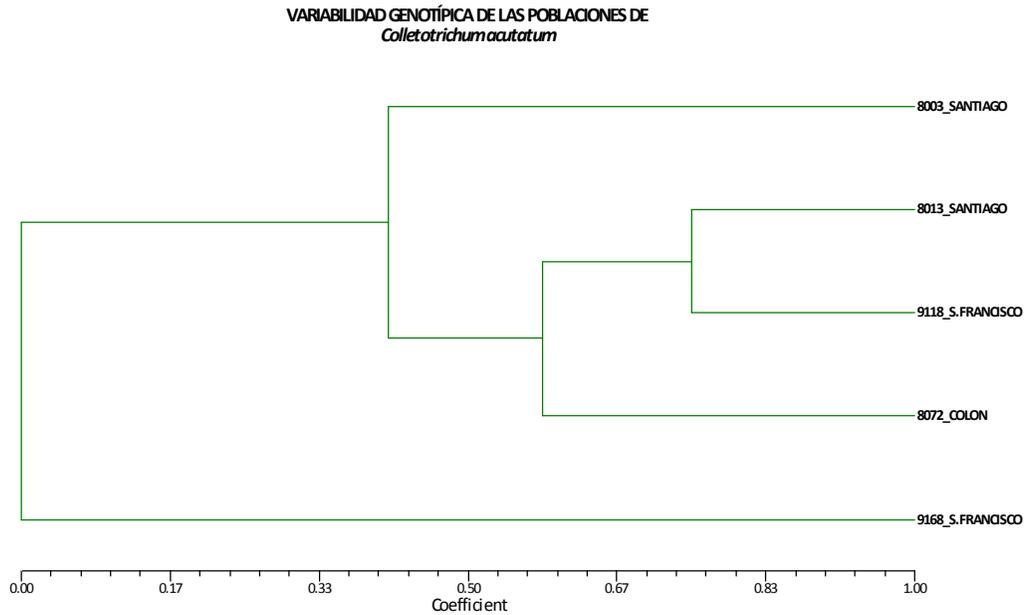
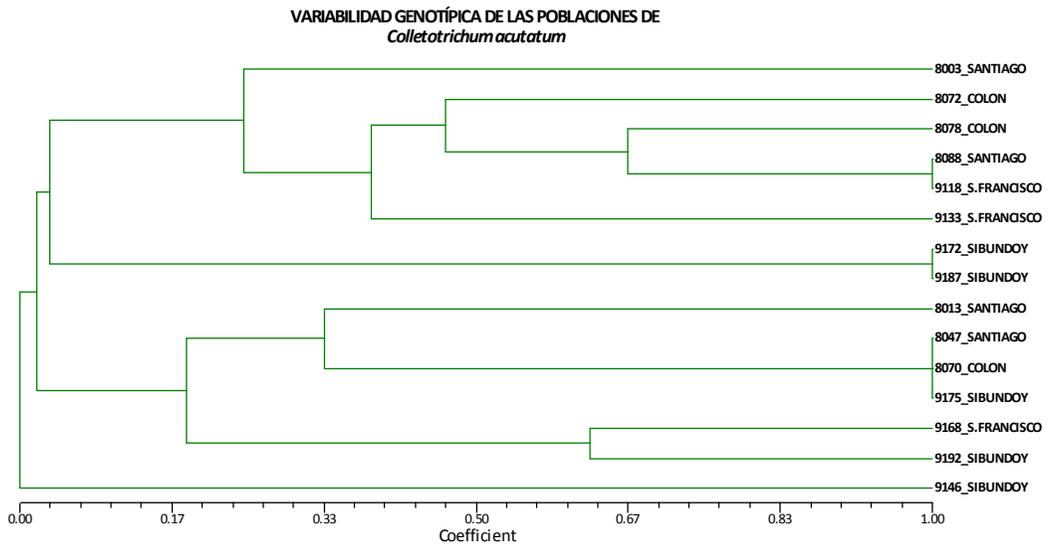
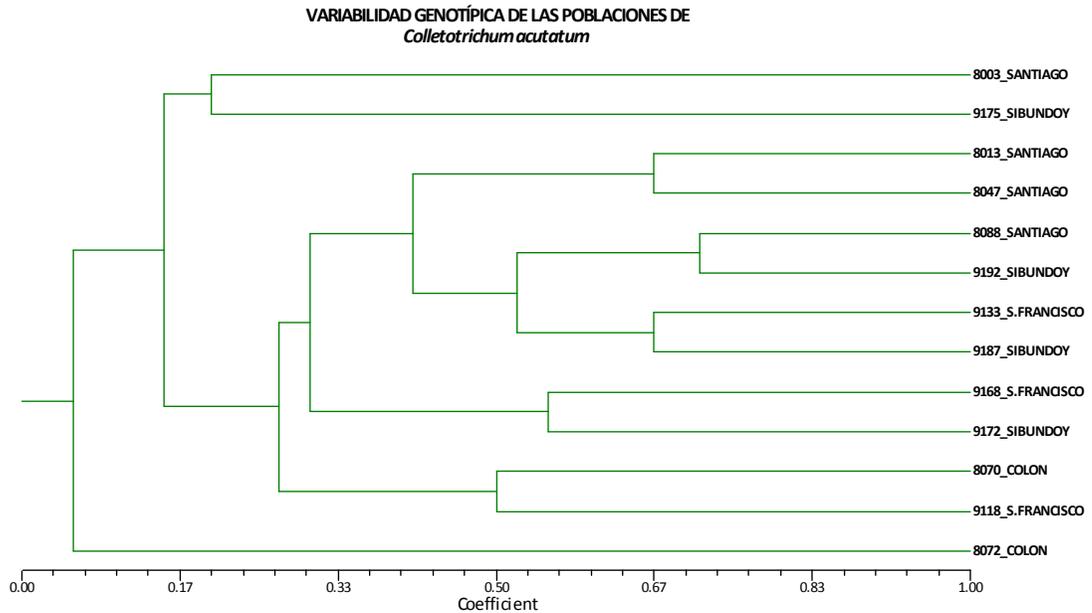


Figura 25. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Putumayo mediante RAPD con la combinación M: OPAN19/OPD02. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard. Fuente: Esta investigación.



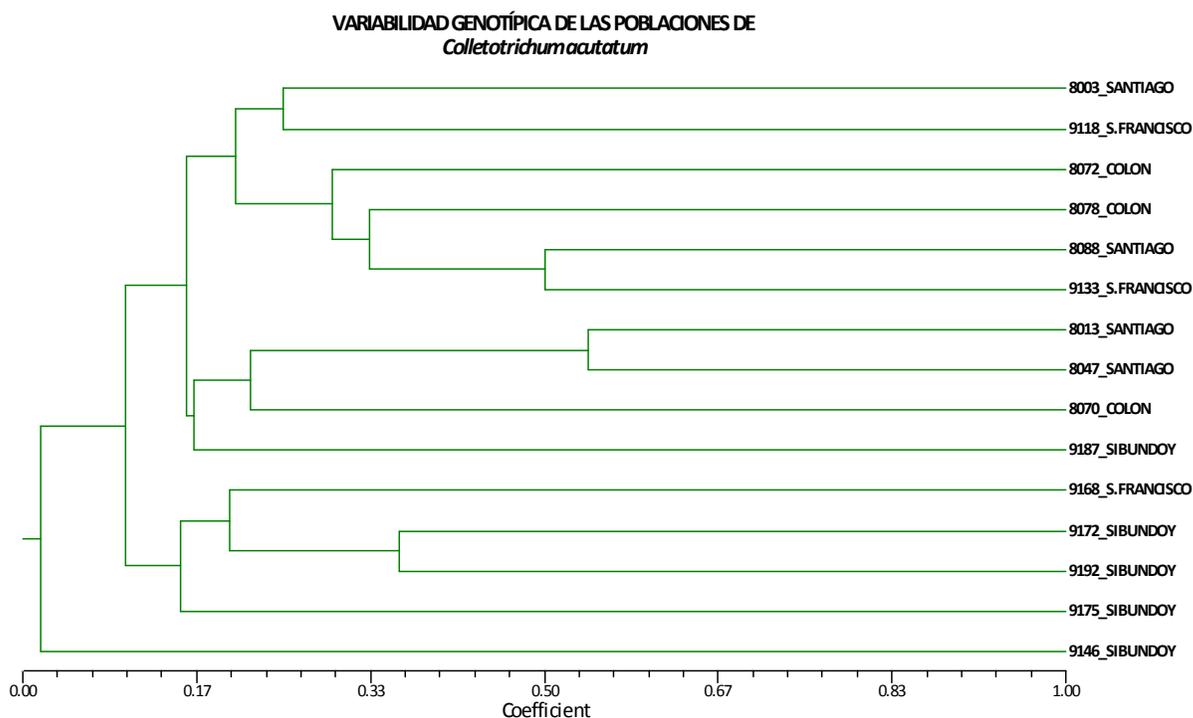
El dendrograma generado con la combinación Z (OPAN19 / OPD03) presentó una correlación cofenética de 88,8% lográndose distinguir dos grupos principales (Figura 26), en el primer grupo se reúne la mayoría de los aislamientos de Putumayo, la cercanía genética más estrecha fue entre los aislamientos MP8088 (Santiago) y MP9192 (Sibundoy) con un grado de similitud del 71,4%, seguido de los aislamientos MP9133 (San Francisco) y MP9187 (Sibundoy) con 66,7% de asociación, al igual que los aislamientos MP8013 y MP8047 de Santiago. El segundo grupo formado por el aislamiento MP8072 de Colón último en incorporarse al cluster.

Figura 26. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Putumayo mediante RAPDs la combinación Z: OPAN19/OPD03. Dendrograma construido usando el método de UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard. Fuente: Esta investigación.



En el dendrograma consenso para los quince aislamientos de *C. acutatum* de Putumayo generado con la unión de los datos proporcionados por las diferentes combinaciones se muestra la formación de dos grupos principales (Figura 27), el primer grupo formado por el aislamiento MP9146 de Sibundoy presentó caracteres genéticamente diferentes al resto. El segundo grupo se divide en dos subgrupos, en el que la distancia genética más estrecha fue para los aislamientos MP8013 y MP8047 de Santiago con un 54,2% de similitud, seguido por los aislamientos MP8088 (Santiago) y MP9133 (San Francisco) con un 50% de similitud. En general, los conglomerados resultantes muestran un bajo grado de homogeneidad interna y un alto grado de heterogeneidad externa, para los aislamientos de *C. acutatum*, lo que sugiere una alta variabilidad genotípica en la población del departamento de Putumayo.

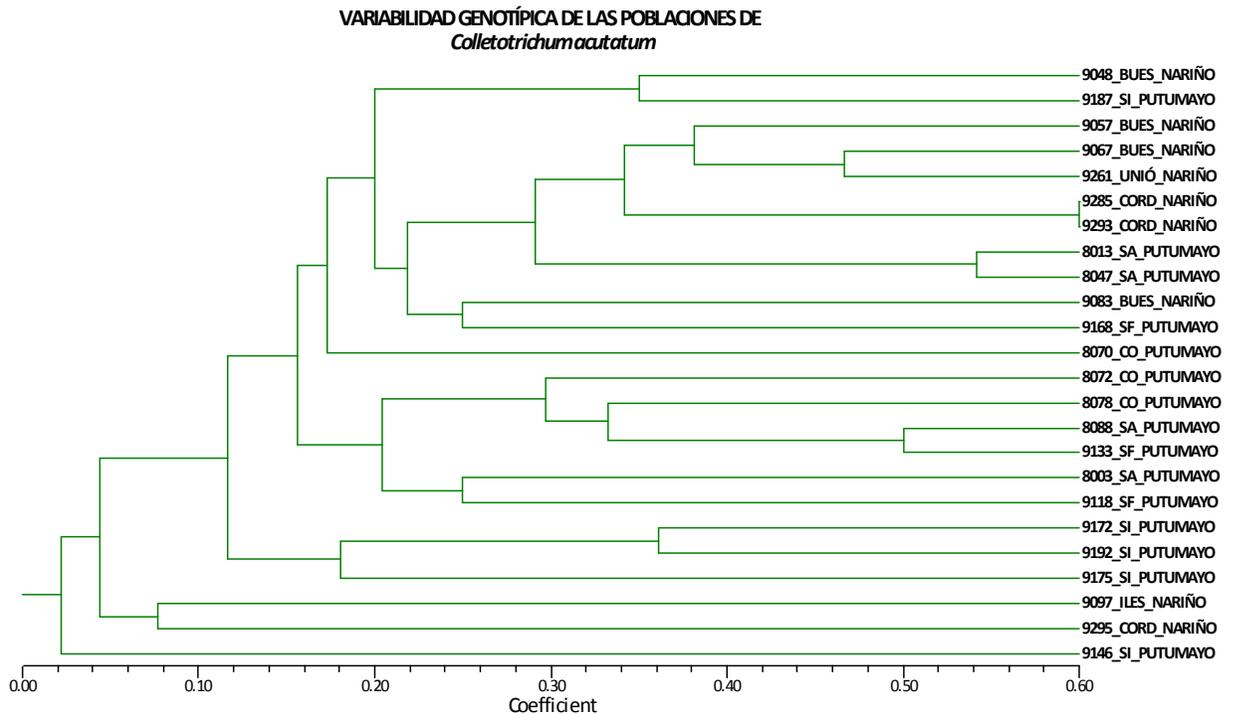
Figura 27. Distribución de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de Putumayo. Dendrograma consenso obtenido utilizando 96 bandas mediante el uso de RAPDs, construido usando el método UPGMA, empleando el coeficiente de Jaccard, con un valor $r = 0.83995$. Fuente: Esta investigación.



9.1.3. Distancia genética para las poblaciones de *C. acutatum* procedentes de Nariño y Putumayo

Se calcularon las distancias genéticas con los primers analizados para los 24 aislamientos de *C. acutatum*, obteniéndose una matriz consenso donde se observa la agrupación entre los aislamientos producida por el polimorfismo de las bandas de DNA (Figura 28). En el dendrograma generado mediante el método UPGMA con una correlación cofenética de 84,20% se muestran dos grupos definidos. La cercanía genética más estrecha fue entre los aislamientos de Córdoba MP9285 y MP9293 con un grado de similitud del 60%, seguido por los aislamientos MP8013 y MN8047 ambos pertenecientes a Santiago con un grado de asociación del 54,17%, el aislamiento MP9146 perteneciente a Sibundoy (Putumayo) fue el más distante presentando caracteres completamente diferentes al resto siendo el último en incorporarse al cluster. Como se muestra en la figura 28, los conglomerados resultantes muestran un bajo grado de homogeneidad interna y un alto grado de heterogeneidad externa, lo que sugiere una alta variabilidad intrapoblacional, las dos poblaciones analizadas (Nariño y Putumayo) no se diferenciaron.

Figura 28. Distribución de los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* procedentes de Nariño y Putumayo mediante DNA 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 $r = 0.83675$. Fuente: Esta investigación.



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 91,1% de la diversidad genética se atribuye a la variación dentro de las dos poblaciones estudiadas en comparación con el 8,86% de 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 0,08862 (Tabla 14), indicando que ambas son similares y presentan frecuencias alélicas iguales.

En este estudio se encontró una alta variabilidad genotípica intraespecífica (91,1%) en *C. acutatum*, a pesar de estar potencialmente limitado en su capacidad de generar variación debido a su reproducción de tipo asexual (Chaozu *et al.*, 1998). Esta alta variación dentro de las poblaciones puede explicarse debido a la existencia de diferentes mecanismos de generación de variabilidad genética como los reordenamientos cromosómicos descritos por Masel y colaboradores (1990) en *C. gloeosporioides*, el desmembramiento de cromosomas más grandes y los procesos de división irregulares en *C. lindemuthianum* (Sicard *et al.*, 1997; O'Sullivan *et al.*, 1998). Otro mecanismo por el cual se genera la diversidad genética es la existencia de compatibilidad vegetativa en diferentes especies del género incluida *C. acutatum* (Katan, 2000; Wharton & Diéguez, 2004) dando origen a genotipos distintos a los precursores, debido a la generación de cariotipos diferentes o por la recombinación de caracteres (Rivera, 2007).

Tabla 14. Resumen del análisis de la varianza molecular de dos poblaciones de *Colletotrichum acutatum* (Nariño y Putumayo) evaluadas mediante DNA Polimórfico amplificado al azar. Fuente: Esta investigación.

Fuente de variación	Suma de los cuadrados	Componentes de varianza	Variación porcentual	F_{TS}	P-valor
Entre las poblaciones	33.739	1.02913	8.86207	0.08862	0.00000
Dentro de las poblaciones	486.844	10.58357	91.13793		
Total	520.583	11.61270	100 %		

Diferentes estudios han demostrado que existe gran diversidad genética y heterogeneidad dentro de *C. acutatum* (Johnston & Jones, 1997; Lardner, *et al.*, 1999; Freeman, 2001), una de las hipótesis de esta diversidad es descrita por Guerber y Correl (2001) quienes reportaron la recombinación sexual entre las cepas del hongo y la generación del teleomorfo, *Glomerella acutata* en cultivo, 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.

Uno de los procesos de compatibilidad vegetativa que aparentemente podría ser fuente importante de variabilidad en los hongos patógenos y puede ser responsable (al menos en parte) de la alta diversidad registrada en *Colletotrichum sublineolum* y explicar la aparición de nuevas razas fisiológicas es la recombinación genética a través de procesos parasexuales (Souza-Paccola *et al.*, 2003). El parasexualismo es un proceso generador de variabilidad sin que medie 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, este proceso da como resultando recombinaciones de caracteres que dan origen a genotipos muy distintos a los precursores (Rivera, 2007). 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.*, 2003).

Además de estos mecanismos de variabilidad en los hongos patógenos de plantas se ha descrito que la variabilidad genética es una condición presente y que paulatinamente se ha ido incrementado en los agroecosistemas (Araya, 1993) 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 presentes en estos ecosistemas 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.

Una posible explicación para la variabilidad genotípica intrapoblacional encontrada en *C. acutatum* en la zona de estudio puede ser atribuida a la interacción patógeno-hospedero, como respuesta adaptativa a la presión de selección ejercida por su principal albergador *Solanum betaceum*. El hospedero, su manejo y el clima pueden tener una marcada influencia en la estructura genética de los patógenos de plantas, con frecuencia muestran una especialización patogénica con respecto a las especies y los cultivares hospederos (Orozco, 2006). En los ambientes naturales y los agrícolas, esta especialización es dinámica, ya que pueden aparecer rápidamente nuevas razas con un rango de hospederos diferentes (Orozco, 2006). En su investigación Orozco (2006) determinó que las poblaciones de *C. acutatum* aisladas en limón mexicano fueron genéticamente diferentes a las poblaciones de *C. acutatum* obtenidas de naranja Valencia y limón Persa, evidenciando el efecto del hospedero sobre la variabilidad genotípica. Resultados similares fueron obtenidos con poblaciones de *C. lindemuthianum* en frijol (González *et al.*, 1998) y *C. truncatum* en lentejas (Ford *et al.*, 2004), en donde la variabilidad genética del hongo se pudo atribuir a las diferencias en el germoplasma y el hospedero usado. Una posible explicación para la diversidad genética encontrada entre aislamientos de *C. acutatum* puede atribuirse a una respuesta adaptativa frente a la gran diversidad de hospederos disponibles (Milgroom, 1995, 1996; Wyand y Brown, 2003).

La zona de estudio es centro de diversidad primaria de *S. betaceum*, encontrándose tanto variabilidad a nivel de especies, como dentro de cada una de las taxa, considerándose genéticamente diverso y con una amplia diferenciación de variedades (Lobo, 2001). Específicamente en las regiones de estudio no existen variedades comerciales de *S. betaceum*, sino poblaciones locales, multiplicándose y seleccionándose por parte de los cultivadores (Lobo, 2001). La siembra del frutal se realiza principalmente por semilla derivada de poblaciones particulares y materiales introducidos de otras regiones; es usual la siembra de mezclas de diversos tipos de cultivares que se diferencian por el color de sus frutos, en especial en las zonas de pequeños cultivos (Lobo, 2006).

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, 2001). 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 la difusión de enfermedades y la existencia de materiales heterogéneos tanto de la planta como de los posibles fitopatógenos.

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

Los resultados aquí presentados demuestran claramente la variabilidad de *C. acutatum*, lo cual evidencia la evolución del patógeno en la zona de estudio; las grandes variaciones genotípicas encontradas en los aislamientos de los departamentos de Nariño y Putumayo le permitirían posiblemente ser capaces de adaptarse más rápidamente a los ambientes fluctuantes (Agrios, 2005). La rapidez con que un agente patógeno puede evolucionar podría ser indicado por la cantidad de variación genética mantenida dentro de una población y que eventualmente puede ser utilizado para predecir cuánto tiempo una medida de control es probable que sea eficaz (McDonald & Linde, 2002).

CONCLUSIONES

- Mediante el análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) se logró determinar el porcentaje de polimorfismo, la variabilidad genotípica mediante la generación de un dendrograma que mostró una distribución heterogénea de los 24 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* procedentes de Nariño y Putumayo, distribución que puede estar influenciada por el tipo de hospedero, su manejo y el clima.
- Los polimorfismos generados por RAPD's evidenciaron una elevada variabilidad genética dentro de las dos poblaciones de estudio, demostrando una estructura no clonal. Es muy posible que la causa de las diferencias a nivel de DNA observadas entre los aislamientos se deba a cambios de nucleótidos, delección del sitio de unión, inserciones y/o delecciones, estos cambios en el DNA podrían estar relacionados con una alta tasa de mutación del patógeno o bien a procesos parasexuales en donde existe recombinación genética de tipo asexual.
- No fueron detectadas diferencias significativas en la variabilidad genética de ambas poblaciones, a pesar de proceder de dos regiones con condiciones geográficas y climáticas propias de los sitios.

RECOMENDACIONES

- Se hace necesaria la continuidad de este tipo de proyectos ampliando el número de aislamientos, conjuntamente con la planificación de un muestreo sistemático más amplio que abarque diferentes áreas o zonas de producción de tomate de árbol e incorpore a otros hospederos de *C. acutatum*.
- Ante la dificultad para discriminar entre aislamientos de la misma especie se recomienda ejecutar un estudio de variabilidad genética para *C. acutatum* empleando dos tipos de marcadores moleculares sensibles como los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) o microsatélites que permitan detectar con mayor precisión las variaciones dentro y entre los aislamientos.
- Teniendo en cuenta que el problema más limitante para la producción del tomate de árbol en Colombia es la antracnosis causada por las especies de hongos patógenos *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides*, siendo reportada solo la especie *C. acutatum* para los departamentos de Nariño y Putumayo por el grupo de investigación GENPAT, se recomienda complementar los resultados de RAPD con pruebas *in vitro* de compatibilidad vegetativa para determinar el tipo de recombinación asexual que le ha atribuido aparentemente una alta variabilidad genética, la cual posiblemente le esté permitiendo adaptarse más rápidamente a los ambientes fluctuantes.

ANEXOS

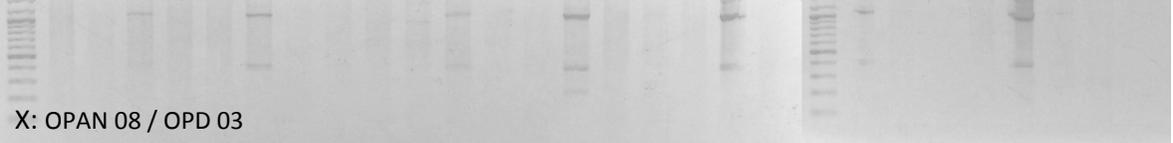
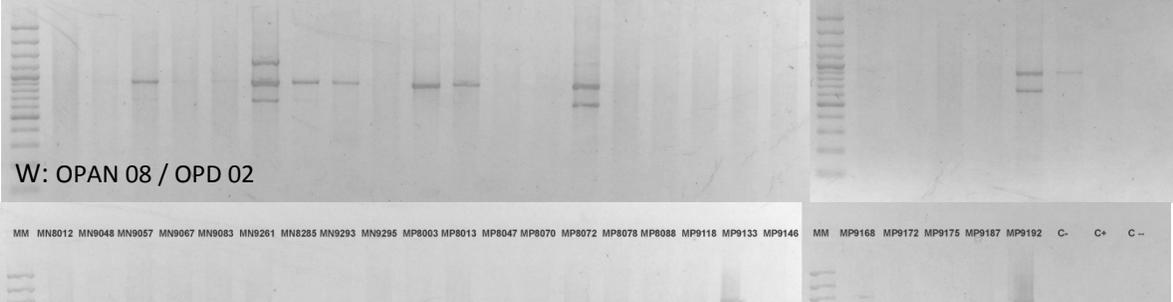
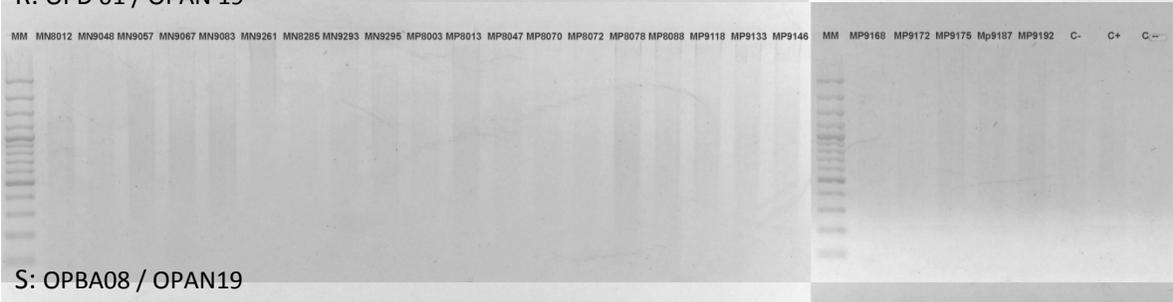
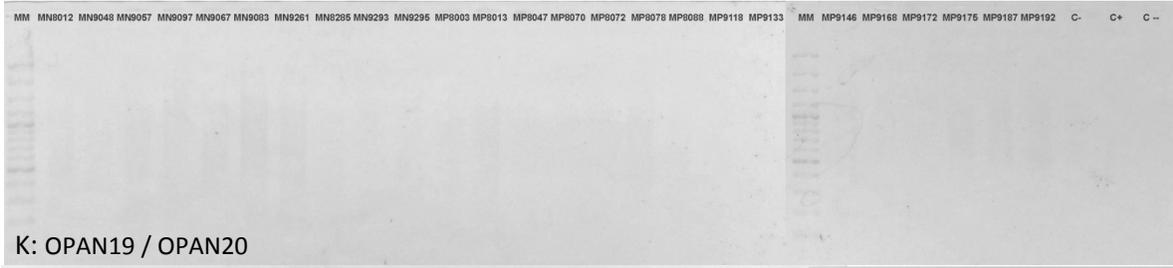
Anexo A. Morfología y lugar de procedencia de los 25 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* evaluados.

NÚMERO	MUNICIPIO	VARIABLE	COLOR DE LA COLONIA FRONTAL	COLOR DE LA COLONIA REVERSO	BORDE DE LA COLONIA	MICELIO	SECTORES	ESPORULACIÓN
		CEPA						
NARIÑO								
1	PASTO	MN8012	Naranja claro	Naranja claro	Ondulado	Algodonoso	SÍ	Naranja
2	BUESACO	MN9048	Naranja grisáceo	Naranja grisáceo	Entero	Ralo	No	Naranja
3		MN9083	Naranja grisáceo		Ondulado	Algodonoso	SÍ	Naranja
4		MN9067	Blanco grisáceo	Naranja claro	Entero	Algodonoso	No	Naranja
5		MN9057	Naranja grisáceo	Naranja grisáceo	Ondulado	Algodonoso	No	Naranja
6		ILES	MN9097	Naranja claro	Naranja claro	Ondulado	Ralo	No
7	LA UNION	MN9261	Gris	Naranja grisáceo	Entero	Ralo	SÍ	Naranja
8	CÓRDOBA	MN9285	Naranja grisáceo	Naranja grisáceo	Irregular	Ralo	SÍ	Naranja
9		MN9293	Blanco grisáceo		Entero	Algodonoso	SÍ	Naranja
10		MN9295	Naranja grisáceo	Naranja grisáceo	Entero	Ralo	SÍ	Naranja

PUTUMAYO								
11	SANTIAGO	MP8047	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	Entero	Algodonoso	SÍ	Gris
12		MP8003	Gris	Blanco grisáceo	Entero	Algodonoso	SÍ	Gris
13		MP8113	Blanco grisáceo	Naranja grisáceo	Entero	Algodonoso	SÍ	Naranja
14		MP8088	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	Ondulado	Algodonoso	No	Gris
15	COLÓN	MP8072	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	Ondulado	Algodonoso	No	Naranja
16		MP8070	Naranja claro	Naranja claro	Entero	Ralo	SÍ	Naranja
17		MP8078	Blanco grisáceo	Naranja grisáceo	Entero	Algodonoso	SÍ	Naranja
18	SAN FRANCISCO	MP9168	Gris	Blanco grisáceo	Ondulado	Algodonoso	SÍ	Gris
19		MP9118	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	Entero	Algodonoso	SÍ	Gris
20		MP9133	Naranja claro	Naranja claro	Entero	Algodonoso	No	Naranja
21		MP9187	Naranja grisáceo	Naranja grisáceo	Ondulado	Algodonoso	SÍ	Naranja
22	SIBUNDOY	MP9172	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	Entero	Ralo	SÍ	Gris
23		MP9146	Naranja grisáceo	Naranja grisáceo	Entero	Algodonoso	SÍ	Naranja
24		MP9192	Blanco grisáceo	Blanco	Ondulado	Ralo	No	Naranja
25		MP9175	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	Entero	Algodonoso	No	Naranja

Anexo B. Patrón de bandas obtenidas para los 25 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* mediante la amplificación aleatoria de DNA polimórfico, RAPDs, utilizando las diferentes combinaciones. MM: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (100-3000bp).





BIBLIOGRAFIA

- ADASKAVEG, J. & HARTIN, R. 1997. *Characterization of Colletotrichum acutatum isolates causing Anthracnose of almond and peach in California*. En: *Phytopathology*. 87: 979-987.
- AINSWORTH, G.C. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 6th ed. CMI, Kew, Surrey, England. 663. p. 1971. En: *Caracterización morfológica y cultural de aislados de Colletotrichum spp. causantes de la Antracnosis del olivo*. En: OLIVEIRA, R. MORAL, J. BOUHMIDI, K. TRAPERO, A. 2005. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31: 531-548.
- ÁLVAREZ, Elizabeth; OSPINA, Cesar Andrés; MEJIA, Juan Fernando & LLANO, Germán A. 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):1-8.
- ARAUZ, Cavallini Luis Felipe. *Fitopatología, un enfoque agroecológico*. Primera edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. 471 p. 1998.
- ARAYA, Carlos Manuel. 2003. *Coevolución de Interacciones Hospedante – Patógeno en Frijol Común*. *Fitopatología Brasileira* 28 (3):221-228.
- ARISTIDE, Elzine. 2012. Colectivo Maloka. Colombia. [On line] Disponible en: <http://www.colectivomaloka.org/uploads/editor/mapas/01a_mapa-fisico.jpg>. Consultado el: 25 de noviembre 2010.
- ARROYO, Cordero & Teodoro, Francisco. 2004. *Caracterización del proceso de infección de Colletotrichum acutatum Simmonds en plantas de fresa (Fragaria x ananassa Duch.): estructura y ultraestructura*. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. 190 p.
- ACN, Atlas Climatológico Nacional. 2010. Segunda Parte: Distribución Espacio-Temporal de las variables del clima – Tercera Parte: Aspectos Departamentales. [On line] Disponible en: <<http://pronosticos.ideam.gov.co/jsp/loader.jsf?!Servicio=Publicaciones&ITipo=publicaciones&IFuncion=loadContenidoPublicacion&id=815>> Última actualización: miércoles, 20 octubre 2010.
- BAILEY, J. & JEGER, M. *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Editorial Wallingford UK: CAB International. 402 p. 1992.
- BARDAKCI, F. 2001. *Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD*. *Turkish Journal of Biology* 25: 185-196.

- BAXTER, A. P., G. C. A. Van der Westhuizen & A. EICKER. 1985. *A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus Colletotrichum*. *Phytophylactica*. 17: 15-18. En: Gaztambide, Alameda Idarnis. 2005. Distribución vertical y temporal de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) sobre una siembra comercial de gandul (*Cajanus cajan* L.). Tesis de Maestría en Ciencias en Biología. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez.
- BURDON, J. & SILK, J. 1997. *Sources and patterns of diversity in plant pathogenic fungi*. *Phytopathology*. 87:664-669.
- BROOKER, N.; LESLIE, J. & DICKMAN, M. 1991. *Nitrate non-utilizing mutants of Colletotrichum and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness*. *Phytopathology*. 81: 672-677.
- CADAVID, Marcela; KELEMU, Segenet & OSORIO, Jairo. 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.
- CADENA, Esteban. 2000. *Estudio de prefactibilidad para tomate de árbol*. [On line] Disponible en: <http://www.corpoamazonia.gov.co:85/Region/Putumayo/Putumayo_natural.html>. Consultado el: 15 de octubre 2010.
- CASARRUBIAS, Carrillo Ubando; GONZÁLEZ, Chavira Mario Martin; CRUZ, Hernández Andrés; CÁRDENAS, Soriano Elizabeth; NIETO, Ángel Daniel & GUEVARA, González Ramón Gerardo. 2003. *Variabilidad genética del género Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz. Sacc. aislado de frutos de papaya (Carica papaya L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. En: Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Ciudad Obregón, México. 21(003): 338-345.
- CERÓN, Laura E.; HIGUERA, M. Blanca L.; SÁNCHEZ, N. Jimena; BUSTAMANTE, Silvia & BUITRAGO Gustavo. 2006. *Crecimiento y desarrollo de Colletotrichum gloeosporioides f. alatae durante su cultivo en medios líquidos*. En: *Acta Biológica Colombiana*. 11 (1): 99 - 109.
- CHAOZU, He.; ANCA, G.; RUSU, Agnieszka M.; POPLAWSKI, John A.; IRWIN, G. & MANNERS, John M. 1998. *Transfer of a Supernumerary Chromosome Between Vegetatively Incompatible Biotypes of the Fungus Colletotrichum gloeosporioides*. En: *Genetics Society of America* 150: 1459–1466.
- CHILTON, S. J. P. & WHEELER, H. E. 1949. *Genetics of Glomerella*. VII. *Mutation and segregation in plus cultures*. En: *American Journal of Botany* 36: 717-721. En: WHARTON, Phillip S. & DIÉGUEZ,

Uribeondo, Javier. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. En: Anales del Jardín Botánico de Madrid 61(1): 3-22.

- DENOYES, Rothan Béatrice; GUÉRIN, Guy; DÉLYE, Christophe; SMITH, Barbara; MINZ, Dror; MAYMON, Marcel & FREEMAN, Stanley. 2002. *Genetic Diversity and Pathogenic Variability Among Isolates of Colletotrichum Species from Strawberry*. En: Phytopathology 93 (2):219-228.
- DÍAZ A., ROJAS N., MERZON G. & MARTÍNEZ A. *Biología 2000*. McGraw Hill Interamericana de Venezuela S.A. Caracas.986 p. 2001.
- FORD, R.; BANNIZA, S.; PHOTITA, W. & TAYLOR. P. W. J. 2004. *Morphological and molecular discrimination of Colletotrichum truncatum causing anthracnose on lenti in Canada*. En: Australasian Plant Pathology 33:559-569.
- FREEMAN, Stanley; KATAN, Talma & SHABI, Ezra. 1996. *Characterization of Colletotrichum gloeosporioides Isolates from Avocado and Almond Fruits with Molecular and Pathogenicity Tests*. En: Applied and Environmental Microbiology. 62 (3). 1014-1020.
- FREEMAN, Stanley; KATAN, Talma & SHABI, Ezra.1998. *Characterization of Colletotrichum species responsible for Anthracnose diseases of various fruits*. En: Plant Disease. 82(6): 596-604.
- FREEMAN, S., Minz, D., JURKEVITCH, E., MAYMON, M., & SHABI, E. 2000. *Molecular analyses of Colletotrichum species from almond and other fruits*. En: Phytopathology 90:608-614.
- GARCÍA, Ángela. 2004. COLOMBIA. Disponible en: <<http://pwp.supercabletv.net.co/garcru/colombia/Colombia/index.html>> Última fecha de actualización: 13 de Abril del 2004.
- GAZTAMBIDE, Alameda Idarnis. 2005. *Distribución vertical y temporal de Glomerella cingulata (Colletotrichum gloeosporioides) sobre una siembra comercial de gandul (Cajanus cajan L.)*. Tesis de Maestría en Ciencias en Biología. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez.
- GENPAT. Grupo de investigación Genética de Patosistemas, cuarto informe de actividades del macroproyecto (2010):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 2010. CONVENIO N° 054/08 MADR/CIAT.

- GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; ZAVALA, M. E.; JACOBO, J. L.; HERNÁNDEZ, F.; ACOSTA, J., MARTÍNEZ, O., & SIMPSON, J. 1998. *Characterization of Mexican isolates of Colletotrichum lindemuthianum by using differential cultivars and molecular markers*. En: *Phytopathology* 88:292-299.
- GRIFFITH, Gareth. W. & SHAW, David S. 1998. *Polymorphisms in Phytophthora infestans: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions*. En: *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 4007-4014
- GUERBER, John C. & CORRELL, James C. 2001. *Characterization of Glomerella acutata, the Teleomorph of Colletotrichum acutatum*. En: *Mycologia* 93 (1): 216-229.
- GUNNELL, Pamela S. & GUBLER, W. Douglas. 1992. *Taxonomy and Morphology of Colletotrichum Species Pathogenic to Strawberry*. En: *Mycologia* 84 (2): 157-165.
- GUPTA, V. K.; PANDEY, A.; KUMAR, P.; PANDEY B. K.; GAUR R. K.; BAJPAI V.; SHARMA N. & SHARMA, S. 2010. *Genetic characterization of mango anthracnose pathogen Colletotrichum gloeosporioides Penz. by random amplified polymorphic DNA analysis*. En: *African Journal of Biotechnology* 9 (26): 4009-4013.
- GUTIÉRREZ, Alonso O., NIETO, Ángel D.; GUTIÉRREZ, Alonso J. G.; DELGADO, Sánchez., F. & DOMÍNGUEZ, Alvarez J. L. 2002. *Características morfológicas, culturales y patogénicas de aislamientos de Colletotrichum spp. obtenidos de frutos de guayaba (Psidium guajava L.)* En: *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 24-30.
- IGAC, Instituto Geográfico Agustín Codazzi. 2003. *Mapa del Putumayo 2003*. [On line] Disponible en: <<http://www.zonu.com/fullsize1/2011-08-24-14489/Mapa-del-Putumayo-2003.html>>. *Mapa de Nariño*. [On line] Disponible en: <http://www.zonu.com/Colombia_maps/Narino_Department_Map_Colombia_2.htm>.
- JOHNSTON, Peter R. & JONES, Derek. 1997. *Relationships among Colletotrichum Isolates from Fruit-Rots Assessed Using rDNA Sequences*. En: *Mycologia* 89 (3): 420-430.
- KATAN, Talma & SHABI, Ezra. 1996. *Vegetative compatibility among isolates of Colletotrichum gloeosporioides from almond in Israel*. En: *European Journal of Plant Pathology* 102: 597-600.
- KATAN, T. 2000. *Vegetative compatibility in Colletotrichum*. In: WHARTON, Phillip S. & DIÉGUEZ-URIBEONDO, Javier. 2004. *The biology of Colletotrichum acutatum*. En: *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(1): 3-22.

- KELEMU, Segenet; SKINNER, Daniel Z.; BADEL, Jorge L.; MORENO, Claudia X.; RODRÍGUEZ, María X.; FERNANDES, Celso D.; CHARCHAR, María J. & CHAKRABORTY, Sukumar. 1999. *Genetic diversity in South American Colletotrichum gloeosporioides isolates from Stylosanthes guianensis, a tropical forage legume*. En: European Journal of Plant Pathology 105: 261–272.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVIS, J. C. & STALPERS. J. A. 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. 9th ed. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 656 p. En: Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. OLIVEIRA, R. MORAL, J. BOUHMIDI, K. TRAPERO, A. 2005. En: Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 31: 531-548.
- KOSMAN, E. & LEONARD, KJ. 2005. *Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species*. En: Molecular Ecology 14:415-424.
- LACADENA, Juan Ramón. 1996. *Citogenética*. Editorial Complutense, S. A. Impreso en España. 937 p.
- LANDRY, P. A. & LAPOINTE, F. J. 1996. *RAPD problems in phylogenetics*. En: 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*. En: Mycological Research 103 (3): 275 - 285.
- LOBO, Arias Mario. 2001. Propuesta: *Tomate de árbol (Cyphomandra betacea Sendt), frutal promisorio para la diversificación del agro andino*. Programa de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetales CORPOICA C.I. La Selva Rionegro Ant. Convocatoria 2001. Fondo Regional De Tecnología Agropecuaria. Secretaría Técnica-Administrativa.
- LOBO, Arias Mario. 2006. *Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual*. En: Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria 7(2): 40-54.
- LUNA, Martínez Francisco; FLORES, Martínez Alberto & PONCE, Noyol Patricia. 2003. *Caracterización molecular de aislados de Sclerotium cepivorum mediante análisis del polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar*. En: Elementos 49: 53-59.
- MANNERS, S.; STEPHENSON, S.; CHAOZO, H. & MACLEAN. 2000. *Gene transfer and expression in Colletotrichum gloeosporioides causing Anthracnose on Stylosanthes*. En: *Colletotrichum host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. DOV Prusky, STANLEY Freeman & MARTIN B. DICKMAN Minnesota. APS Press the American Phytopathological Society. 393 p.

- MARTÍN M. P.; GARCÍA Figueres F. & Trapero, A. 2002. *Iniciadores específicos para detectar las especies de Colletotrichum causantes de la antracnosis de los olivos*. En: Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 28: 43-50.
- MARTÍNEZ, Andrés G. 2007. *Toda Colombia*. Disponible en <<http://www.todacolombia.com/departamentos/narino.html>>.
- MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.; BARRIO, E.; GARCIA, M. & QUEROL, A. 2000. *Identification of Colletotrichum species responsible for Anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region*. En: FEMS Microbiology Letters 189: 97-101.
- MASEL, A.; BRAITHWAITE, K.; IRWIN, J. & MANNERS, J. 1990. *Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen Colletotrichum gloeosporioides*. En: Current Genetics 18: 81-86.
- MCDONALD, B. A., & LINDE, C. 2002. *Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance*. En: Annual Review of Phytopathology 40: 349-379.
- MEYER, Andréia da Silva; DALIRSEFAT, Seyed Benyamin & ZIYAEDDIN, Mirhoseini Seyed. 2009. *Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with amplified fragment length polymorphism markers in the silkworm, Bombyx mori*. En: Journal of Insect Science 9 (71): 1-8.
- MILGROOM, M. G. 1995. *Analysis of population structure in fungal plant pathogens*. Pp. 213-229. In: *Disease analysis through genetics and molecular biology: Interdisciplinary bridges to improved sorghum and millet crops*. LESLIE, J. F. & FREDERIKSEN, R. A. En: Iowa State University press/Ames.
- MILGROOM, M. G. 1996. *Recombinations and the multilocus structure of fungal populations*. En: Annual Review of Phytopathology 34:457-477.
- MONTOYA, Villafañe Hugo Humberto. *Microbiología para el área de la salud y afines*. Segunda editorial. Medellín. Universidad de Antioquia. 254 p. 2008.
- NCBI, NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, (NCBI). [En línea]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consultado en: domingo, 3 de octubre del 2010.
- NARAYANASAMY P. *Molecular biology in plant pathogenesis and disease management*. Editorial Springer Science Business Media. Microbial Plant Pathogens. Volumen 1. 2008

- NEGRETE, J & REDONDO, A. 1997. *Evaluación de la respuesta a la antracnosis, Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Ñames promisorios, *Dioscorea alata* L en Córdoba. Trabajo de grado Ingeniero Agrónomo. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. 61 p.
- OLIVEIRA, R.; MORAL, J.; BOUHMIDI, K. & TRAPERO, A. 2005. *Caracterización morfológica y cultural de aislados de Colletotrichum spp. causantes de la Antracnosis del olivo*. En: Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 31: 531-548.
- OROZCO, Santos Mario & TIMMER, L. W. 2005. *V Congreso Argentino de Citricultura*. Concordia, Entre Ríos, Argentina.
- OROZCO, Santos Mario. 2006. *Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de Colletotrichum acutatum Simmonds de cítricos en México*. Doctorado en Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima.
- O'SULLIVAN, Donal; TOSI, Paola; CREUSOT, Francine; COOKE, Mike; PHAN, Thi Hai; DRON, Michel & LANGIN Thierry. 1998. *Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus Colletotrichum lindemuthianum*. En: Current Genetics 33: 291-298.
- PERES, N. A.; TIMMER, L. W.; ADASKAVEG J. E. & CORRELL, J. C. 2005. *Lifestyles of Colletotrichum acutatum*. The American Phytopathological Society. Plant Disease 89 (8): 784-796.
- PÉREZ, L. SAQUERO & M. BELTRÁN, J. 2003. *Caracterización morfológica y patogénica de Colletotrichum spp. Como agente causal de la antracnosis en ñame Dioscorea spp.* En: Revista Colombiana de Biotecnología 5 (001): 24-35.
- PONTECORVO, G. 1956. *The parasexual cycle in fungi*. En: Annual Review of Microbiology 10: 393-400.
- RIVERA, Coto Germán. *Conceptos introductorios a la fitopatología*. Impreso en Costa Rica. 308 p. 2007.
- ROCA, María Gabriela, DAVIDE, Lisete C.; MENDES-COSTA, María Cristina & WHEALS, Alan. 2003. *Conidial anastomosis tubes in Colletotrichum*. En: Fungal Genetics and Biology 40: 138-145.
- SALDARRIAGA, Cardona A. & CASTAÑO, Arango, R. 2008. *Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora*. Revista Académica Colombiana de Ciencias 32(123): 145-156.

- SANGDEE, Aphidech; Sachan, Sarawut & Khankhum, Surasak. 2011. Morphological, pathological and molecular variability of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose of chilli in the North-east of Thailand. En: African Journal of Microbiology Research 5(25): 4368-4372.
- SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M. & NEEMA C. 1997. *Genetic Diversity and Pathogenic Variation of Colletotrichum lindemuthianum in the Three Centers of Diversity of Its Host, Phaseolus vulgaris*. En: Phytopathology 87: 807-813.
- SOUZA Paccola, E. A.; FÁVARO, L. C. L.; CASELA, C. R. & PACCOLA Meirelles, L. D. 2003. Genetic Recombination in *Colletotrichum sublineolum*. En: Journal of Phytopathology 151 (6): 329-334.
- SUTTON, B. 1992. *The genus Glomerella and its anamorph Colletotrichum*. In Bailey, J. A., and Jeger, M. J. *Colletotrichum – Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford. Pp. 1-26. En: Gaztambide Alameda, Idarnis. 1995. Distribución vertical y temporal de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) sobre una siembra comercial de gandul (*Cajanus cajan* L.). Tesis de Maestría en Ciencias en Biología. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez.
- TENOVER, Fred C.; ARBEIT, Robert D.; GOERING, Richard V.; MICKELSEN, Patricia A.; MURRAY, Barbara E.; PERSING, David H. & SWAMINATHAN, Bala. 1995. *Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing*. En: Journal of Clinical Microbiology 33 (9): 2233-2239.
- THAN, Po Po; PRIHASTUTI, Haryudian; PHOULIVONG, Sitthisack; TAYLOR, Paul W. J. & HYDE, Kevin D. 2008. *Chilli anthracnose disease caused by Colletotrichum species*. En: Journal of Zhejiang University SCIENCE B9(10):764-778.
- THAUNG, M. 2008. *Coelomycete systematics with special reference to Colletotrichum*. The Mycological Society of Japan and Springer. En: Mycoscience 49:345-350.
- TOZZE, Junior Hugo J.; MELLO, Margarita & MASSOLA, Junior Nelson. 2006. *Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de Colletotrichum sp. causadores de antracnose em solanáceas*. En: Summa Phytopathologica 32 (1): 71-79.
- UREÑA-PADILLA, A. R.; Mackenzie, S. J.; BOWEN, B. W. & LEGARD, D. E. 2002. *Etiology and Population Genetics of Colletotrichum spp. Causing Crown and Fruit Rot of Strawberry*. En: Phytopathology 92(11):1245-1252.
- VON, Arx J. A. 1970. *A revision of the fungi classified as Gloeosporium*. Bibliotheca Mycologica. 24: 1-203. En: Gaztambide Alameda, Idarnis. 1995. Distribución vertical y temporal de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) sobre una siembra comercial de gandul (*Cajanus cajan*

L.). Tesis de Maestría en Ciencias en Biología. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez.

- WALKER, J. 1980. *Taxonomy, specimens and plant diseases*. Daniel McAlpine Memorial Lecture. Australasian Plant Pathology Society. <http://www.australasianplantpathologysociety.org.au/McAlpine/DM3.htm>. Consultado el 11 de septiembre de 2010.
- WALKER, John M. & RAPLEY, Ralph. *Molecular Biometrics Handbook*. Second edition. Editorial Humana Press. Lúcia Maria da Cunha Galvão and Eliane Lages-Silva Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). 1103 p. 2008.
- WALLER, J. & BRIDGE, P. 2000. *Recent advantages in understanding Colletotrichum diseases of some tropical perennial crops*. En: *Colletotrichum biology, pathology and control*. Bailey, J. Jeger, M. Eds. CAB international.
- WHARTON, Phillip S. & DIÉGUEZ, Uribeondo Javier. 2004. *The biology of Colletotrichum acutatum*. En: *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(1): 3-22.
- WILLIAMS, John G.K.; KUBELIK, Anne R.; LIVAK, Kenneth J.; RAFALSKI, J. Antoni & TINGEY, Scott V. 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. En: *Nucleic Acids Research*. 18(22): 6531 p.
- WYAND, R. A., & BROWN, J. K. M. 2003. *Genetic and forma specialis diversity in Blumeria graminis of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution*. En: *Molecular Plant Pathology* 4:187-198.