

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *Colletotrichum* spp. AGENTE
CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS EN MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth)**

AURA ISABEL AGREDA AGREDA

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

2016

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *Colletotrichum* spp. AGENTE
CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS EN MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth)**

AURA ISABEL AGREDA AGREDA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Biólogo
Modalidad trabajo de investigación**

ASESORES

LUZ ESTELA LAGOS MORA

M. Sc. en Ciencias Biológicas

SANDRA LORENA ÁLVAREZ

M. Sc. en Ciencias Agrarias

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

2016

NOTA DE RESPONSABILIDAD

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

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

Nota de aceptación

Luz Estela Lagos Mora
Asesora

Sandra Lorena Álvarez
Asesora

Sonia Mahecha Vahos
Jurado

Luis Alfredo Molina
Jurado

San Juan de Pasto, 1 de Marzo de 2016

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones, posgrados y relaciones internacionales de la Universidad de Nariño por la financiación de esta investigación.

A mis asesoras de trabajo de grado Luz Estela Lagos Mora y Sandra Lorena Álvarez por su permanente disposición y orientación durante el desarrollo de este estudio.

A Sonia Mahecha Vahos y Luis Alfredo Molina jurados de este trabajo de grado por su apoyo, recomendaciones y orientación.

A mis compañeros del grupo de investigación Genética y Evolución de organismos tropicales GENPAT: Diana, Harold y Víctor por sus aportes y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

Al director e integrantes del grupo de investigación MEGA y Frutales Andinos, por la colaboración con el préstamo de algunos equipos.

A mis compañeros de semestre por su amistad y apoyo incondicional.

A mi familia por todo su amor, paciencia y colaboración.

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de cumplir con una de las tantas metas que me he propuesto.

A mi mamá, mi papá y mi hermano ejemplo de amor y perseverancia, quienes sin importar la situación me han enseñado que la actitud, paciencia y el trabajo constante son los mejores caminos para alcanzar las metas propuestas.

A Didier y Violeta, mi familia, ejemplo de amor, paciencia y comprensión. Ustedes mi principal motivación para continuar a pesar de las dificultades.

RESUMEN

Se realizó la caracterización fenotípica y genotípica de *Colletotrichum* spp. aislado de cultivos de mora de castilla ubicados en el corregimiento del Encano (municipio de Pasto) y del municipio de Ipiales mediante la descripción morfológica (forma y color de la colonia, micelio, aspecto de la colonia) y estimación de la tasa de crecimiento. La identificación de la especie se realizó con la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal y se determinó la variabilidad genética mediante marcadores RAMs. Los resultados obtenidos de la caracterización morfológica mostraron una alta variabilidad fenotípica, el fenograma indica la formación de 11 grupos y el área de crecimiento a los siete días de registro osciló entre 9 y 59 cm². Con la amplificación de la región ITS se logró identificar a *C. acutatum* como agente causal de la antracnosis en Ipiales y en El Encano, sin embargo ocho aislados no se lograron identificar. El análisis de variabilidad genética a partir de los datos moleculares indican que *C. acutatum* y *Colletotrichum* spp. son altamente variables. El AMOVA determinó que el 84,74% de la variación está dentro de las dos poblaciones en comparación con el 15,26% que se generó entre las poblaciones (Ipiales y El Encano).

Palabras claves: Mora de castilla, *Colletotrichum*, caracterización fenotípica y genotípica, ITS, RAMs.

ABSTRACT

Phenotypic and genotypic characterization of *Colletotrichum* spp. were performed from cultures isolated of Andean blackberry located in the village of Encano (municipality of Pasto) and the municipality of Ipiales by morphological description (shape and color of the colony, mycelium appearance) and estimation of the growth rate. The species identification was performed with the amplification of ribosomal DNA ITS region and genetic variability was determined by markers RAMs. The results of the morphological characterization showed high phenotypic variability, the dendrogram indicates the formation of 11 groups and growth area registration seven days ranged from 9 to 59 cm². With the amplification of the ITS region was identified as *C. acutatum* causal agent of anthracnose in Ipiales and El Encano, however eight isolates were not able to identify. The analysis of genetic variability from molecular data indicate that *C. acutatum* and *Colletotrichum* spp. they are highly variable. The AMOVA determined that 84.74% of the variation is within the two populations compared to 15, 26% was generated between populations (Ipiales and the Encano).

Keywords: Andean blackberry, *Colletotrichum*, Phenotypic and genotypic characterization, ITS, RAMs.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1 MORA DE CASTILLA (<i>Rubus glaucus</i> Benth)	18
2.1.1 Posición taxonómica	18
2.1.2 Descripción botánica.....	18
2.1.3 Generalidades.....	19
2.2 ANTRACNOSIS.....	20
2.3 <i>Colletotrichum</i> spp.....	20
2.3.1 Posición taxonómica (NCBI, 2010).....	21
2.3.2 Generalidades.....	21
2.3.3 Procesos de infección de <i>Colletotrichum</i>	22
2.3.4 <i>Colletotrichum acutatum</i>	24
2.3.5 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	25
2.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	25
2.4.1. Descripción morfológica.....	25
2.4.2. Análisis estadístico descriptivo y clasificación de datos morfológicos.....	26
2.5 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	27
2.5.1. Espaciadores de transcripción interna ITS (Internally Transcribed Spacers).....	27
2.5.2. Random Amplified Microsatellites (RAMs)	28
2.5.3. Determinación de la variabilidad genética.....	28
3. ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE INVESTIGACIÓN	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1 ÁREA DE ESTUDIO	35
4.2 AISLAMIENTO DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	36
4.3 OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	38
4.3.1 Área de crecimiento	38
4.3.2 Descripción Morfológica	39
4.4 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	40
4.4.1 Extracción de ADN.....	40

4.4.2 Amplificación de la región ITS.....	42
4.4.3 Determinación de variabilidad genética mediante marcadores microsátélites RAMs.	44
4.4.4 Análisis de datos	46
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1 Aislamiento de <i>Colletotrichum</i> spp.....	47
5.2. Caracterización fenotípica de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	48
5.2.1 Área de crecimiento	55
5.3 CARACTERIZACION GENOTÍPICA.....	57
5.3.1 Extracción de ADN.....	57
5.3.2. Optimización del protocolo de amplificación de la región ITS	58
5.3.3. Amplificación de la región ITS.....	59
5.3.4 Optimización del protocolo para amplificación con primers RAMs	61
5.3.5 Determinación de la variabilidad genética.....	62
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES.....	70
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación espacial del área de estudio, en Colombia y en el departamento de Nariño.	35
Figura 2. Aislamiento de <i>Colletotrichum</i> spp. a partir de tallos de mora de castilla con síntomas de antracnosis.....	37
Figura 3. Edición de las imágenes en el programa ImageJ para calcular el área de crecimiento diario de cada una de los aislados. Fuente: ésta investigación.	39
Figura 4. Obtención de micelio de <i>Colletotrichum</i> para extracción de ADN. A. Apariencia del micelio después de 15 días de crecimiento en caldo de papa. B y C. Secado de micelio.	41
Figura 5. Síntomas de antracnosis en A. tallo B. ramas y C. frutos. Alrededor de las lesiones se puede observar un borde definido de color azul-violeta. En los botones florales y frutos se puede observar necrosis y momificación.	47
Figura 6. Conidios de <i>Colletotrichum</i> spp. del aislado A. MCI075 correspondiente al municipio de Ipiales y B. MCE005 correspondiente al corregimiento El Encano..	49
Figura 7. Crecimiento de los aislados a partir de los tallos de mora de castilla después de 10 días de crecimiento. A, B y C. Colonias puras de aislados de <i>Colletotrichum</i> en medio PDA, procedentes del corregimiento El Encano. D, E y F. Colonias puras de los aislados de <i>Colletotrichum</i> procedentes del municipio de Ipiales.....	49
Figura 8. Fenograma de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. procedentes del corregimiento El Encano (MCE) y del municipio de Ipiales (MCI).	50
Figura 9. Descripción morfológica de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. procedentes de mora de castilla de cultivos ubicados en el corregimiento El Encano y del municipio de Ipiales. Cada una de las imágenes representa a un aislado de cada grupo formado en el fenograma.	54
Figura 10. Curva de crecimiento de los aislados de mora de castilla procedentes del corregimiento el Encano. Fuente: ésta investigación.....	55
Figura 11. Curva de crecimiento de aislados de mora de castilla procedentes del municipio de Ipiales.....	56
Figura 12. Gel de electroforesis en agarosa al 0,9% del ADN de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. de mora de castilla procedentes A. del corregimiento El Encano, B. del municipio de Ipiales y C. de los controles positivos para las especies <i>C. acutatum</i> (V064) y <i>C. gloeosporioides</i> (V016)..	57

Figura 13. Amplificación de 3 aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. más un control positivo para <i>C. gloeosporioides</i> (V016) y uno para <i>C. acutatum</i> (V064) usando los primers Cglnt + ITS4 bajo condiciones reportadas por Afanador-Kafuri et al., 2014.....	59
Figura 14. Geles de amplificación de ADN de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. procedentes del corregimiento El Encano (MCE) y del municipio de Ipiales (MCI) con cebadores específicos para <i>C. acutatum</i> (Calnt2+ITS4).	60
Figura 15. Gel de verificación de la amplificación de 8 aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. procedentes del corregimiento El Encano más un control positivo para <i>C. gloeosporioides</i> con los primers Cglnt +ITS4..	60
Figura 16. Gel de amplificación con los primers CCA, AG, CGA, CA y ACA con dos concentraciones de ADN..	62
Figura 17. Patrón de bandas obtenidas para los 30 aislados de <i>Colletotrichum acutatum</i> y <i>Colletotrichum</i> spp. y los controles positivos para <i>C. gloeosporioides</i> (V016) y <i>C. acutatum</i> (V064), mediante los primers RAMs AG y CGA.....	63
Figura 18. Distribución de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. y de <i>C. acutatum</i> procedentes del corregimiento El Encano y del municipio de Ipiales mediante la amplificación con microsátélites RAMs GA y CGA. Fenograma consenso contruido a partir de UPGMA con el con el coeficiente de Sorenson-Dice.	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características macroscópicas de las colonias de <i>Colletotrichum</i>	37
Tabla 2. Categorización de las características morfológicas a evaluar.	39
Tabla 3. Secuencia de nucleótidos de los cebadores a utilizar en la amplificación de las regiones ITS.....	43
Tabla 4. Mezcla para la amplificación de la región ITS.	44
Tabla 5. Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la determinación de la variabilidad genética mediante marcadores RAMs.	45
Tabla 6. Mezcla para la amplificación de microsatélites RAMs.	45
Tabla 7. Frecuencia de bandas polimórficas obtenidas de los aislados de <i>Colletotrichum acutatum</i> y de <i>Colletotrichum</i> spp. de Ipiales y El Encano mediante microsatélites RAMs.....	64
Tabla 8. Parámetros de diversidad genética de <i>C. acutatum</i> y <i>Colletotrichum</i> spp.....	65
Tabla 9. Resumen del análisis de varianza molecular de las poblaciones de <i>C. acutatum</i> y <i>Colletotrichum</i> spp. de Ipiales y El Encano.....	65

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Registro de muestras y cultivadores corregimiento El Encano. 78

ANEXO 2. Registro de muestras y cultivadores del Municipio de Ipiales. 79

INTRODUCCIÓN

El cultivo de frutales se presenta como una alternativa económica en la agricultura colombiana debido al crecimiento de la demanda nacional e internacional y la activación de la industria post cosecha; uno de los frutales más cultivados a nivel nacional es la mora de castilla *Rubus glaucus*. El 55% de la producción es destinado al consumo interno, se ofrece en fresco en supermercados y plazas de mercado donde se usa para preparar bebidas y dulces, mientras que para el procesamiento industrial se vende el 25% de la producción para la preparación de jugos, pulpas, mermeladas, conservas, confites y colorantes. Una mínima proporción de la producción se exporta procesada o congelada en razón a la alta perecebilidad que presenta la fruta en fresco (Ruiz & Ureña, 2009).

Sin embargo, su cultivo presenta considerables pérdidas económicas (30% en pre-cosecha y hasta el 70% de pérdidas en post cosecha (DANE-ENA, 2013) por el gran número de enfermedades que lo atacan tales como la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), el moho gris (*Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.), el mildew veloso (*Oidium* sp), mildew polvoso (*Peronospora sparsa* Berk), roya (*Gerwasia lagerheimii* (Magnus)), marchitez y pudrición de la raíz (*Verticillium* sp., *Fusarium* sp. y *Rosellinia* sp.) (CORPOICA, 2011).

La antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. alcanza una incidencia del 52,9% en los cultivos de la zona cafetera, Valle y Cundinamarca. Se relaciona a las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* como agentes causales de la enfermedad que destruye los tallos de la planta y el fruto en post cosecha. Este patógeno penetra por los bordes tiernos de las ramas las cuales se ennegrecen y las hojas recién formadas se marchitan, produciendo lesiones ovaladas de color morado violáceo en los tallos y ramas que los cubren parcial o totalmente, luego se tornan negras y se secan generando una necrosis dentro y fuera de la parte de la planta afectada originando el marchitamiento de las hojas recién formadas (CORPOICA, 2011).

Este problema fitosanitario requiere estudios a nivel morfológico y molecular para determinar la o las especies y la complejidad genética de los aislados que infectan los cultivos de mora en las zonas productoras de Colombia (Marulanda *et al.*, 2007). Las características morfológicas, culturales, pruebas de patogenicidad y marcadores moleculares como ITS han permitido la identificación de las especies causantes de antracnosis en frutales del trópico, información relevante que soporta el desarrollo de estrategias para su control (Álvarez *et al.*, 2005; Lizarazo, 2005; Oliveira *et al.*, 2005; Rodríguez, 2007; Morales *et al.*, 2009; Alarcón, 2012; Santacruz, 2013; Alvarez, 2013; Afanador-Kafuri *et al.*, 2014).

Por lo tanto con este trabajo se caracterizó fenotípica y genotípicamente el agente causal de la antracnosis en cultivos de mora de castilla en el departamento de Nariño, como un aporte en la toma de decisiones para el control de la enfermedad.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípica y genóticamente al agente causal de la antracnosis en cultivos de mora de castilla en zonas productoras del departamento de Nariño.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar fenotípicamente a los aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos, mediante morfología y morfometría geométrica.

Identificar molecularmente los aislados de *Colletotrichum* spp. mediante el análisis de la región ITS del ADN ribosomal y determinar su variabilidad a través del uso de microsatélites.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth)

2.1.1 Posición taxonómica

La posición taxonómica de la mora de castilla según (TROPICOS, 2009) es:

Reino: Vegetal

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotyledonea

Orden: Rosae

Familia: Rosaceae

Género: *Rubus*

Especie: *Rubus glauc*

2.1.2 Descripción botánica

La mora es una planta perenne, arbustiva, de porte semierecto, conformada por varios tallos que se organizan en la corona y en la base de la planta. Son redondeados, en conjunto se denominan macollas o lampiños, poseen aguijones que se extienden hasta los peciolos y la nervadura central del envés de las hojas; las hojas son alternas con tres folíolos oval-lanceolados, dos basales y uno terminal, bordes aserrados, de color verde en el haz y blanquecino en el envés; las ramas florecen en racimos terminales que caducan una vez ocurrida la fructificación, algunas ramas se hacen procumbentes cayendo al suelo y produciendo enraizamiento de los ápices. El sistema radicular es profundo, puede llegar hasta un metro dependiendo del suelo y el subsuelo (CORPOICA, Tecnología para la producción de frutales de clima frío moderado., 2005) (IaVH, 2008).

2.1.3 Generalidades

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), es una fruta originaria de las zonas tropicales de América principalmente Ecuador, Colombia, Panamá, Salvador, Honduras, Guatemala, México y Estados Unidos (Franco & Giraldo, 2000). En Colombia se cultiva principalmente en la zona andina y estribaciones de la cordillera occidental, en los departamentos de Santander, Antioquia, Cundinamarca, Nariño, Cauca, Huila, Tolima, Valle del Cauca, Caldas, Quindío, Boyacá y algunos sectores del Meta (CORPOICA, 2011). Según (DANE-ENA, 2013) el área de cultivo aproximada fue de 7.007 hectáreas plantadas de las cuales 4.922 se encuentran en edad productiva con un rendimiento de 15 toneladas por hectárea, lo que significa una producción de 73.856 toneladas anuales.

La mora de castilla es cultivada entre los 1.200 y 3.500 m.s.n.m. aunque el rango más apropiado es de 1.600 a 2.400 metros, con una temperatura de 16°C a 18°C, humedad relativa de 70 a 80% y precipitación de 1.200 a 1.700 milímetros anuales. La fase de cultivo se da en tres etapas teniendo en cuenta el desarrollo de la planta: La primera en la que se obtienen las nuevas plantas ya sea de forma sexual o asexual, la segunda de formación o desarrollo vegetativo donde se conforma la planta y la tercera etapa productiva que se inicia a los ocho meses después del trasplante y se mantiene constante durante varios años debido a que la planta presenta una floración y fructificación permanente observándose picos de producción cada cinco o seis meses (CORPOICA, 2011).

El manejo y sostenimiento del cultivo comprende diferentes labores que se deben adelantar para lograr una plantación sana y productiva, tales como tutorado el cual consiste en amarrar la planta a una estructura sencilla sobre la que se soporta la planta y se dirige su crecimiento; las podas para favorecer la aireación y entrada de luz a la planta, de esta manera también se logra una mayor producción y calidad de la fruta y facilita el proceso de cosecha; el plan de fertilización; el control de malezas; el aporque que consiste en cubrir con tierra el pie de la planta para darle mayor consistencia y así conseguir que crezcan nuevas raíces para asegurar la nutrición más completa de la planta y conservar la humedad durante más tiempo y por último el control de enfermedades y plagas de las cuales se resalta las causadas por hongos como

Botrytis cinerea (botrytis), *Peronospora sparsa* Berk (mildeo veloso), *Colletotrichum* spp (antracnosis), plagas como el barrenador (*Hepialus* sp), burrita de la virgen o picudo de la mora (*Compus* sp.), perla de tierra (*Eurhizococcus colombianus*), barrenador del cuello de la planta (*Zasecelis* sp.), babosas (*Milax gagates*) y mosca de la fruta (*Anastrephas* sp.) (DANE-ENA, 2013) (Pronatta-CORPOICA, 2014).

2.2 ANTRACNOSIS

La antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. es considerada la enfermedad de mayor impacto en cultivos frutales debido a su amplia distribución y a las pérdidas que ocasiona en pre y post cosecha (CORPOICA, 2011), aumentando su ocurrencia y severidad en épocas lluviosas y con alta humedad en el ambiente haciendo más difícil su control (Pronatta-CORPOICA, 2014)

La antracnosis en ramas y tallos se evidencia con la aparición de manchas necróticas. En los frutos inicia con lesiones aceitosas que se convierten en manchas de coloración oscura, cubriéndolo parcial o totalmente (CORPOICA, 2013;DANE, 2014).

En condiciones climáticas de alta humedad en el ambiente, el hongo desarrolla estructuras de reproducción llamadas conidios que se reconocen por su coloración rosada en la parte inferior de la lesión finalizando en un proceso de momificación (Alarcón & Chavarriaga, 2007).

2.3 *Colletotrichum* spp.

El género *Colletotrichum* fue establecido por Corda (1831) como un hongo que se caracteriza por presentar conidios hialinos, curvados o falcados, fusiformes y un acérvulo setoso, está conformado por 39 especies que causan antracnosis en una amplia gama de cultivos agrícolas y plantas ornamentales y ocasiona pérdidas económicas en pre y post cosecha en regiones tropicales, subtropicales y de clima templado (Sutton, 1992; Bailey & Jeger, 1992; Wharton & Diéguez- Uribeondo, 2004). Las especies de este género son consideradas como las más exitosas dentro de los hongos fitopatógenos ya que afecta hojas, tallos y frutos, y si las

condiciones ambientales no son favorables para su desarrollo, posee estado de latencia o quiescencia (Rai, Cai, & Cannon, 2009).

2.3.1 Posición taxonómica (NCBI, 2010)

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Sordariomycetes incertae sedis

Orden: Phyllachorales

Familia: Phyllachoraceae

Subfamilia: Phyllachoraceae mitospóricos

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

Especies agentes causales de antracnosis en mora de castilla (De la Rotta, Avila , & González , 2002):

Glomerella acutata – *Colletotrichum acutatum*

Glomerella cingulata – *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum boninense (Afanador-Kafuri, González , Gañan, Mejía, & Álvarez , 2014)

2.3.2 Generalidades

Colletotrichum presenta un micelio enramado inmerso, septado que toma coloración hialina hasta castaño pálido. Posee acérvulos, separados o confluentes en forma de disco o de cojín, ceroso, subepidermal, epidermal y subcuticular típicamente con setas o espinas negras en los bordes o entre los conidióforos, está formado por pseudoparénquima con paredes delgadas o gruesas, conidióforos simples, elongados, conidios hialinos, ovoides u oblongados; conidióforos septados o ramificados, cuando son formados desde la parte superior de las células del pseudoparénquima son simples, cortos y erectos. Los conidios aceptados son de forma cilíndrica, fusiforme, de una sola célula que durante la germinación se torna de color castaño pálido, se septan y forman el apesorio (Prusky, Freeman , & Dickman, 2000) (Gatzambide, 2005).

Las especies del género *Colletotrichum* poseen diferentes modelos de comportamiento en la naturaleza, van desde saprófitas a cepas patógenas especializadas con estrecho rango de hospederos. Los conidios se agregan en masas mucilaginosas, generalmente rosadas, muy rosadas, conspicuas y hundidas con un contorno irregular en las lesiones necróticas causadas sobre frutos, hojas y tallos. Algunas lesiones sobre los frutos se pueden presentar como chancros, costras, cicatrices o con forma de verruga (Gatzambide, 2005)

2.3.3 Procesos de infección de *Colletotrichum*

El proceso de infección de *Colletotrichum* spp. está dado por una secuencia de eventos empezando por la llegada del inóculo a los hospederos por medio del agua o dispersión de los conidios que se adhieren a la cutícula de la planta, germinan en un periodo de 12 a 24 horas, se produce el tubo germinal el cual crece generalmente a una distancia de 10 a 20 μm antes de formar el apresorio encargado de penetrar la cutícula. Los conidios están cubiertos por una capa de material fibroso formado por glicoproteínas que contribuyen a la hidrofobicidad de su superficie y podría estar involucrada en la adhesión rápida a la superficie de la planta (Parra, 2008).

La formación del apresorio es una característica distintiva del género y esencial para que ocurra el proceso de infección, con frecuencia son sésiles y se forman al final del tubo germinativo en las puntas de las ramificaciones miceliales (Bailey, O'Connell, Pring, & Nash, 1992). En algunas especies al madurar son de forma globosa oval, o bien lobular (Jeffries, Dodd, Jeger, & Plumbey, 1990). Esta estructura además empieza a diferenciarse cuando se detiene el crecimiento del tubo germinativo conidial y su punta se abulta y se delimita por un septo. Su maduración involucra la formación de un poro de penetración en la base de la célula, la deposición de nuevas capas de la pared y la secreción de materiales mucilaginosos así como el subsecuente depósito de melanina en una capa de la pared celular que puede estar involucrado en la protección del apresorio contra temperaturas extremas y la desecación (Bailey, O'Connell, Pring, & Nash, 1992) (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). En conclusión, el proceso de infección involucra la penetración de la cutícula de la planta y su pared celular a través de la combinación de fuerzas mecánicas producidas por la presión de turgencia y degradación

enzimática (Perfect *et al.*, 1999). Con la adhesión del apresorio el patógeno asegura su contacto con el hospedero y la penetración puede realizarse con éxito (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004).

Durante la colonización de las plantas hospederas, los hongos presentan dos formas de nutrición:

- Biotrofia: los nutrientes son obtenidos de células hospederas vivas.
- Necrotrofia: los nutrientes son adquiridos de células muertas invadidas por el patógeno (Perfect, Hugues, O'Connell, & Green, 1999).

Las especies del género *Colletotrichum* usan principalmente dos tipos de estrategias de colonización, la hemibiotrófica intracelular y la necrotrofica subcuticular intramural (Parra, 2008). Muchas de las especies del género presentan el tipo de estrategia de colonización intracelular con una variación en el tiempo del estado biotrófico que ocurre entre 24 y 72 horas y después de colonizar una o más células la hifa intracelular biotrófica o hifa primaria coloniza progresivamente nuevas células epidermales y mesófilas, llegando a constreñirlas con su paso. Aproximadamente después de 48 horas de la penetración se forma la hifa necrotrofica secundaria que secreta enzimas que degradan la pared celular y se dispersan rápidamente generando las lesiones necróticas (Orozco, 2006) (Contreras, 2006) (Parra, 2008).

Los patógenos intramurales subcuticulares se desarrollan debajo de una cutícula mediante la formación de una red intramural de hifas ocurriendo antes de su disseminación a través del tejido con hifas inter e intracelulares y de ocasionar la muerte del tejido al avanzar la dispersión micelial, en este estado las paredes celulares son degradadas por enzimas fúngicas despolimerizadoras y las células hospederas mueren rápidamente originando la necrosis en el tejido (Parra, 2008).

Colletotrichum spp. también posee la capacidad de sobrevivir en estado de dormancia, latencia o quiescencia cuando las condiciones ambientales o fisiológicas del hospedero le impiden desarrollarse, por ejemplo los cambios bioquímicos durante la maduración del fruto como en el aguacate que contiene compuestos anti fúngicos llamados dienes que se encargan de

regular la quiescencia (Contreras , 2006) (Parra, 2008). Las diferentes especies del género sobreviven a largos periodos después de haber penetrado la capa exterior del fruto en post cosecha el patógeno permanece allí hasta que ocurren cambios en la superficie del fruto los cuales proporcionan las condiciones adecuadas para permitir una infección (Contreras , 2006).

2.3.4 *Colletotrichum acutatum*

Colletotrichum acutatum Simmonds ex Simmonds (1968), originalmente fue descrito en *Carica papaya*, *Capsicum frutescens* y *Delphinium ajacs* en Australia por Simmonds en 1963. Actualmente es conocido como destructor de frutas como fresa, cítricos, manzana, olivo, arándano, mora, entre otras frutas tropicales; además está implicado en enfermedades del pino, en la antracnosis del helecho hoja de cuero, y se han encontrado reportes de una infección en insectos y en tortugas marinas (Manire, Rhinehart, & Sutton, 2002) (Thalinas , Screenivasaprasad, Neves, & Oliveira, 2002) (Marcelino, Gouli, & Parker, 2009) (Peres, Timmer , Adaskaveg, & Correl, 2005) (Garrido , Carbú, & Fernández, 2009) (Damm, Woundenberg, Cannon, & Crous, 2012).

Es un hongo que forma colonias blancas al inicio de su crecimiento que luego se tornan de color gris y en la superficie inferior son de color rosado o carmín. Carecen de esclerocios, poseen apresorios pálidos o café oscuro y son de forma ovalada o de clavo con las márgenes enteras o ligeramente lobuladas, masas conidiales de color rosado a naranja y se diferencia de *C. gloeosporioides* por su lenta tasa de crecimiento (Contreras , 2006). Es uno de los principales hongos patógenos en la agricultura y responsable de importantes pérdidas económicas en frutales, existen muchos estudios sobre los aspectos clave de su biología, a pesar de que tradicionalmente muchos de los aislamientos de *C. acutatum* se habían identificado como *C. gloeosporioides*, estudios basados en la información de la secuencia de ADN brindan nuevos reportes de la separación de las dos especies (López & Gómez, 2008).

El ciclo de vida de *C. acutatum* comprende una fase sexual y otra asexual aunque todavía se desconocen aspectos genéticos de su fase sexual y de su relevancia en la estructura de la población (Damm, Woundenberg, Cannon, & Crous, 2012). (Guerber & Correll, 2001)

describieron a *Glomerella acutata*, la forma sexual de *C. acutatum* como producto de muchos experimentos, y (Talgo, Aamot, Stromeng, Klemsdal, & Stensvand, 2007) observaron la forma sexual sobre frutas de arándano infectadas naturalmente en Noruega.

2.3.5 *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides (Penz. & Sacc.) (1884). Es una especie de amplia distribución especialmente en zonas tropicales y subtropicales, tiene gran variabilidad fenotípica y en cultivo in vitro las características morfológicas varían notablemente (Contreras, 2006) (Rodríguez, González, & Mayek, 2008), produce colonias hialinas unicelulares con morfología de bala (un extremo redondeado y otro puntudo) y acérvulos sub epidérmicos con forma de disco de color oscuro con presencia de setas oscuras que emergen a través de la superficie, los conidióforos son cortos y erectos (Boung, y otros, 2003)

C. gloeosporioides es reconocido como polimórfico en su grado de virulencia, especificidad por hospedero y composición a nivel genético (Hyde, 2009) (Damm, Woundenberg, Cannon, & Crous, 2012) (Pinzón, 2014).

2.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE *Colletotrichum* spp.

2.4.1. Descripción morfológica

La descripción morfológica de *Colletotrichum* spp. se basa en la descripción de la colonia, el micelio y los conidios, tamaño y forma del apresorio, presencia o ausencia de setas, rango de hospedero, tasa de crecimiento y patogenicidad, variables usadas antes de la incorporación de técnicas de caracterización molecular (Beltrán, 2000) (Bucio, Caracterización fenotípica de *Colletotrichum* spp. aislado de aguacate en Michoacán, México., 2008) (Santacruz, 2013).

2.4.2. Análisis estadístico descriptivo y clasificación de datos morfológicos

El análisis cuantitativo de la variación fenotípica y la relación con la variación ambiental y genética ayuda a entender el origen, la naturaleza y las causas de cambio del objeto en estudio, ya que la primera propiedad de los organismos identificable a simple vista es su variabilidad morfológica (Jaramillo, 2014).

Los métodos morfométricos proveen un conjunto de técnicas analíticas para cuantificar la variación morfológica que permite dar respuesta a problemas de taxonomía desde el punto de vista estadístico, el cual ayuda enormemente a entender la naturaleza y la acción de los factores que alteran la distribución espacial del organismo en estudio (Sosa *et al.*, 2002).

La morfometría geométrica es una herramienta matemática con fundamentos biológicos que resulta ser muy efectiva para analizar la fisiología de los organismos y de la escala en la que fueron hechas las mediciones (Dujardin, 2008). Con los datos obtenidos, se pueden realizar análisis multivariados que tienen como objetivo representar los objetos (los individuos o las unidades taxonómicas operacionales) el cual es definido por los ejes de mayor variación, cada uno jerarquizado por la cantidad de variación que explica. Estos análisis son usados para reducir las dimensiones del conjunto de datos, eliminar las correlaciones entre caracteres, calcular los patrones de mayor variación y para ordenar los OTU en un nuevo espacio (Jaramillo, 2014).

Cuando hay muchos grupos la ordenaciones de los individuos puede ser confusa por lo tanto, es mejor realizar un análisis de agrupación jerárquica (análisis de cluster), y uno de los métodos más usados es el de comparación por pares usando promedios aritméticos no ponderados UPGMA, los cuales generan dendogramas donde se puede evaluar la distribución de los individuos y de los grupos de acuerdo con su similitud (Jaramillo, 2014).

El UPGMA es el método más sencillo en reconstrucción de árboles, originalmente fue diseñado para la construcción de fenogramas (diagramas que reflejan las similitudes fenotípicas entre los OTU'S) pero también se puede utilizar para la construcción de árboles filogenéticos si la tasa de evolución entre los OTU'S es aproximadamente constante (Acero, 2007).

2.5 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE *Colletotrichum* spp.

El uso de marcadores moleculares en los estudios de taxonomía de hongos ha clarificado las relaciones entre muchos taxa fungales, las técnicas moleculares permiten el análisis de cada fracción del genoma, ya sea de copia única o altamente repetitivo, segmentos codificantes o no codificantes, segmentos conservados o hipervariables del genoma nuclear u organelar, además permiten identificar especies que son morfológicamente similares (Contreras , 2006) (Santacruz, 2013).

Las técnicas más utilizadas para la identificación este fin son: amplificaciones vía PCR (Polymerase Chain Reaction) con cebadores o primers específicos, análisis de las regiones codificadoras del ADN ribosomal (ITS) y secuenciación; y Microsatélites (SSR) Random amplified micro satélites (RAMs), Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) para determinar niveles de variabilidad genética en la población (Parra, 2008) (Cai, y otros, 2009).

2.5.1. Espaciadores de transcripción interna ITS (Internally Transcribed Spacers)

El ribosoma de los eucariotas posee dos subunidades de ADN ribosomal (rDNA) y está codificado por tres genes, la subunidad grande (28S), la subunidad pequeña (18S) y el gen 5.8S, separados por las regiones de los espaciadores de transcripción interna ITS que por el hecho de ser intrones conforman un área de alta variabilidad al no tener una función biológica aparente y por esto acumula mutaciones neutrales a lo largo del tiempo permitiendo diferenciar individuos relacionados genéticamente (Cruz, 2003), ésta región es quizá el fragmento de ADN más secuenciado en hongos ya que es de gran utilidad para estudios de sistemática molecular a nivel de especie (Orozco, 2006) (Rodríguez A. , Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD, , 2007).

2.5.2. Random Amplified Microsatellites (RAMs)

Los microsatélites RAMS son regiones de secuencias de ADN pequeñas y repetidas, generalmente de dos a tres nucleótidos, los cuales pueden o no estar asociados con genes. Estas regiones son a menudo altamente variables y muy útiles para medir similitudes entre especies o variedades seleccionadas. El estudio con RAMS, se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es un método altamente reproducible y permite la detección de polimorfismo en el ADN intra e interespecífico, y los patrones obtenidos pueden ser usados para estudios poblacionales. Otra de las ventajas de la técnica es que no requieren estimación exacta de la cantidad de ADN antes de la reacción, lo cual es muy útil al analizar muchas muestras de una población y además se puede usar para la identificación de especies o razas (González , 2003).

2.5.3. Determinación de la variabilidad genética

La variabilidad genética es definida como la variedad de alelos y genotipos presentes en el grupo de estudio. La cantidad y tipo de variabilidad genética en una población se ve afectada por factores como la selección, la endogamia, la deriva genética, el flujo génico y mutación, procesos que otorgan respuestas a cambios medio ambientales que les permite a las especies sobrevivir (Hedrick, 2005).

Para el estudio de la variabilidad genética se han planteado varios estadísticos que permiten cuantificarla y comprenderla. Cada estadístico propuesto aprecia diferentes aspectos de la variabilidad genética y los más empleados son la riqueza alélica (A), el índice de contenido polimórfico (P), la heterocigosidad observada (H_0) y la heterocigosidad esperada (H_e) (Fontdevila & Moya, 1999) (Hedrick, 2005) (Allendorf, Gordon, & Sally, 2013).

Riqueza alélica: la riqueza alélica (A) es el número medio de alelos por locus y cuantifica el número total de alelos diferentes detectado en cada uno de los loci de una población (Fontdevila & Moya, 1999), se calcula así:

$$A = \frac{n}{L}$$

Donde n es el número de alelos detectado en todos los loci y L es el número de loci analizados.

Polimorfismo: el polimorfismo o la proporción de loci polimórficos (P) es una medida del número de loci variables en una población y se calcula dividiendo el número de loci polimórficos entre el número total de loci analizados (Allendorf, Gordon, & Sally, 2013).

Heterocigosidad Observada: es el número de heterocigotos en un locus entre el número total de individuos muestreados. Estima la probabilidad en organismos con cruzamiento al azar, de que dos alelos escogidos en una población sean diferentes, aunque no refleja la cantidad de variación genética en las poblaciones de organismos que se reproducen asexualmente o por autofecundación (Frankham *et al*, 2009). Para una población H_0 se calcula como la media inter-loci de la frecuencia genotípica de los individuos heterocigotos mediante la expresión (Hedrick, 2005):

$$H_0 = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \frac{(N_{heterocigotos})_i}{N_i} \quad (0 \leq H_0 \leq 1)$$

Donde L es el número total de loci analizado en una población, $(N_{heterocigotos})_i$ es el número absoluto de individuos heterocigotos para el locus i y N_i es el número total de individuos analizados para el locus i .

Heterocigosidad esperada: el método más adecuado para medir la variación genética es el promedio de heterocigosidad o diversidad genética, según Nei (1987), ya que puede ser definida en términos de frecuencias alélicas. La H_e , es definida como la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población, cuando las poblaciones están bajo equilibrio Hardy-Weinberg, la heterocigosidad puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica. Por lo

tanto la H_e cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los loci (Hedrick, 2005).

La H_e , se expresa para una población con un n mayor a 50 individuos, como:

$$H_e = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L (1 - \sum_{j=1}^n P_{il}^2) \quad (0 \leq H_e \leq 1)$$

Donde P_{il} es la frecuencia del alelo j en el locus l y L es el número total de loci analizados.

En el caso de que el número de individuos en una población sea menor a 50, la H_e se expresa como:

$$\hat{H}_e = \frac{1}{L} \left[\frac{2N}{2N-1} \sum_{l=1}^L (1 - \sum_{j=1}^n P_{il}^2) \right] \quad (0 \leq H_e \leq 1)$$

Donde N es el tamaño de la población (Hedrick, 2005).

Las relaciones existentes entre las accesiones en estudio y el análisis de la estructura poblacional se estiman mediante el análisis de conglomerados. Los datos de los alelos en pares de bases se transforman en datos binarios y se disponen en una matriz denotando la presencia de un alelo como (1) y la ausencia como (0), esta información se la utiliza para calcular matrices de valores de similitud usando los coeficientes de Jaccard o DICE dependiendo del tamaño de la población y se construyen los dendogramas.

3. ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE INVESTIGACIÓN

La caracterización del agente causal de la antracnosis en mora de castilla ha sido estudiada debido a los daños que causa en los cultivos en pre y post cosecha, a través de la caracterización fenotípica y genotípica de *Colletotrichum* spp. se ha logrado identificar a nivel de especie aislados de hospederos de interés comercial en especial de frutales para el desarrollo de alternativas de control más eficientes y amigables con el medio ambiente.

Desde el año 2000 se han hecho descripciones morfológicas usadas como marcadores para discriminar entre especies de *Colletotrichum* como los son tamaño y forma de los conidios, color de la colonia, aspecto del micelio, pruebas de patogenicidad además del uso de herramientas moleculares como la amplificación de la región ITS (internal transcriber spacers) para identificar al patógeno en mango (Muñoz *et al.*, 2003), guanábana (Álvarez *et al.*, 2005), limón y tomate de árbol (Cadavid *et al.*, 2007), café (Rodríguez, 2007), tomate de árbol (GENPAT-MADR, 2012) ají y pimentón (Santacruz, 2013) banano y aguacate (Gañan *et al.*, 2015); además se han implementado herramientas moleculares que permiten determinar la variabilidad genética de la especie o especies identificadas como lo son los RAMs (Random amplified microsatelites) (Álvarez *et al.*, 2005; Santacruz, 2013) RAPDs (Random Amplified Polymorphic ADNs) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Cadavid *et al.*, 2007; Rodríguez, 2007; GENPAT-MADR, 2012). Los anteriores estudios reportan a las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* como las principales agentes causales de la antracnosis en estos frutales.

En mora de castilla sobresalen estudios en los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda, Caldas, Quindío y Cundinamarca sin embargo aún no se han encontrado reportes de estudios realizados en el departamento de Nariño.

De la-Rotta y colaboradores en el 2002, realizaron estudios sobre antracnosis en mora de castilla en Cundinamarca, con el fin de conocer los sitios de infección, penetración, severidad en plantas sin y con aplicación de fungicidas, efecto de la temperatura, precipitación y humedad relativa sobre el avance de la enfermedad ocasionada por el hongo *C. gloeosporioides*.

Encontraron que la enfermedad es frecuente en tallos y ramas podadas, que el patógeno presenta características diferentes sobre el medio de cultivo artificial dependiendo del tipo de tejido del que se aísla. La severidad de la enfermedad es mayor en el estrato superior de la planta con o sin tratamiento de fungicidas. Factores climáticos como la humedad relativa y precipitación presentaron una alta correlación con el avance de la enfermedad sobre los tallos y ramas infectados.

Contreras en el 2006, realizó una caracterización morfológica y pruebas de sensibilidad a benomyl de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de tallos de mora (*Rubus glaucus* Benth) y otros frutales como lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) y mango (*Mangifera indica* L), concluyendo que las especies que infectan estos hospederos son *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

Arenas y colaboradores en el 2007 realizaron la caracterización molecular y patogénica de 53 aislamientos de *Colletotrichum* spp., obtenidos de mora en nueve municipios productores del valle del Cauca. La identificación de las especies la realizaron usando ITS4 con cebadores específicos Cglnt (*C. gloeosporioides*), Calnt2 (*C. acutatum*) y Col1 (*Colletotrichum* spp.) y mediante el análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP). Con este estudio determinaron que el 19% de los aislamientos correspondían a *C. acutatum* y el 81% a *C. gloeosporioides* y esta identificación fue corroborada mediante el análisis SSCP. El análisis de varianza molecular con RAMs mostró que el 19.18% ($P < 0.001$) de la variación ocurría entre los municipios. El 91% de los aislamientos de *C. gloeosporioides* mostraron niveles de patogenicidad intermedio y alto, mientras que en *C. acutatum* el 100% mostró un nivel de patogenicidad bajo o no patogénico. La mayoría de los aislamientos considerados como muy patogénicos provenían del municipio de Buga (29%) y el aislamiento más patogénico fue *C. gloeosporioides* procedente de este municipio.

Marulanda y colaboradores en el 2007, realizaron la identificación de la especie de *Colletotrichum* responsable de la antracnosis en la mora de castilla mediante la utilización de marcadores ITS. Caracterizaron 14 aislamientos y se identificaron dos tipos de crecimiento del hongo: crecimiento rápido y relieve gris ondulado y crecimiento lento con micelio blanco

grisáceo, abundante y esponjoso. En cuanto a las pruebas de patogenicidad, se observó que después de 4 días de inoculación se empiezan a notar los primeros síntomas de la enfermedad. Mediante la identificación con ITS, reportan a las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* como agentes causales de la antracnosis.

Saldarriaga y colaboradores en el 2008, realizaron la caracterización morfológica y molecular del agente causal de la antracnosis en cultivos de mora, tomate de árbol y manzano procedentes de Antioquia y Caldas. La caracterización morfológica la realizaron evaluando coloración de los aislados, tipo y aspecto de micelio, tasa de crecimiento, tamaño y forma de los conidios; y el análisis molecular a través de ITS usando oligonucleótidos específicos para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Encontraron alta variabilidad dentro y entre los aislamientos en las características morfológicas, igualmente inestabilidad de los rasgos fenotípicos a medida que los aislados crecían en el medio de cultivo. El análisis molecular determinó que los aislamientos correspondían a *C. acutatum*. El uso de la técnica molecular ITS permitió diferenciar entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* concluyendo que hubiese sido imposible diferenciar estas dos especies con la caracterización fenotípica.

El Centro Internacional de Agricultura CIAT en el 2010, realizó una caracterización molecular y patogénica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados a la antracnosis de mora en el Valle del Cauca, mediante el uso de ITS y RAMS. Las especies identificadas correspondieron a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Los datos obtenidos a partir de la amplificación con primers RAMs permitieron determinar el grado de variabilidad en las poblaciones (12,5%) y dentro de las poblaciones del 90%.

Afanador-Kafuri y colaboradores en el 2014, realizaron la caracterización de especies de *Colletotrichum* que causan antracnosis en mora de castilla en Colombia a través de la evaluación de características morfológicas, sensibilidad a benomyl, patogenicidad y variabilidad genética. La identificación del agente causal fue realizada con el uso de ITS, y secuenciación de los genes que codifican para actina, β -tubulina 2, calmodulina, quitina sintasa, glutamina sintetasa y gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa. A partir de esta metodología la mayoría de los aislados fueron identificados como *C. gloeosporioides* sensu lato, además mostro alta sensibilidad a

benomyl y fue altamente agresivo. Los aislados identificados como *C. acutatum* sensu lato fueron muy resistentes a benomyl y mostraron agresividad intermedia. Solo 3 de los aislados fueron identificados como *C. boninense* sensu lato. Otras especies identificadas incluyeron *C. frutícola*, *C. kahawae* subsp. Ciggaro, *C. godetiae*, *C. karstii*, *C. brassicola* y *Colletotrichum* spp. Este estudio es el primer reporte de esas especies asociadas con antracnosis en mora de castilla.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

La recolección de las muestras se realizó en 5 veredas del Corregimiento El Encano: Bellavista, El Puerto, Santa Clara, Santa Rosa y Santa Teresita y en 4 veredas del corregimiento San Juan en el municipio de Ipiales: Yanalá Alto, Yanalá Centro, El Rosal y San Juan.



Figura 1. Ubicación espacial del área de estudio, en Colombia y en el departamento de Nariño.
Fuente: Google maps, 2014 (Modificado).

Municipio de Ipiales:

Se ubica en la frontera con la república del Ecuador al sur occidente de Colombia, a $0^{\circ} 49' 44''$ Norte, $77^{\circ} 38' 26''$ oeste en el departamento de Nariño, limita por el norte con Pupiales, Gualmatán, Contadero y Potosí; por el sur: con la república del Ecuador; por el oriente: con Potosí, Córdoba, Puerres, y el departamento del Putumayo; por el occidente: con Aldana, Cuaspud (Carlosama) y la república del Ecuador. Su temperatura fluctua entre 5°C y 21°C ,

altitud 2900 m.s.n.m, y posee una precipitación anual de 871 hasta 917 mm. La distancia de acceso es de 82 km de la ciudad de Pasto (POT-Municipio de Ipiates, 2014).

Corregimiento El Encano (Municipio de Pasto)

Se ubica en el departamento de Nariño, sur occidente de Colombia a 1° 6' 0" Norte, 77° 9' 7" oeste, limita por el norte con el municipio de Buesaco y corregimiento de La Laguna; por el sur con el municipio de Funes y el departamento del Putumayo; por el occidente con los corregimientos de Catambuco, El Socorro y Santa Bárbara; y por el oriente limita con el departamento del Putumayo. Se encuentra a una altura de 2.280 m.s.n.m, su temperatura se encuentra entre los 3°C y 15 °C, y posee una precipitación anual de 2000 mm. Se ubica aproximadamente a 25 km de la ciudad de Pasto (PNN de Colombia, 2010).

4.2 AISLAMIENTO DE *Colletotrichum* spp.

Se colectaron 40 muestras en cada zona de estudio las cuales fueron obtenidas a partir de tallos y frutos de mora de castilla (Figura 2). con síntomas de antracnosis (lesiones necróticas), se almacenaron en bolsas plásticas hasta ser procesadas en el laboratorio.

Cada muestra fue lavada con agua corriente y se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% durante 2 minutos, y se eliminaron las trazas de hipoclorito con agua destilada estéril. Posteriormente se cortaron de cada muestra pequeños fragmentos que contenían tejido con parte sana y parte necrosada o enferma, se sembraron cuatro fragmentos por caja con medio de cultivo PDA suplementado con cloranfenicol (1 cápsula de 500mg/L) y fueron incubadas a temperatura ambiente en oscuridad durante 8 días



Figura 2. Aislamiento de *Colletotrichum* spp. a partir de tallos de mora de castilla con síntomas de antracnosis. Fuente: ésta investigación.

Se realizó la purificación de los aislados transfiriéndolos a una nueva caja Petri con medio PDA y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 días; Para confirmar la presencia del hongo se revisaron las características macroscópicas generales (Tabla 1) y se compararon con 5 cepas de referencia aisladas de tomate de árbol, una cepa de *Colletotrichum acutatum*, una de *Colletotrichum gloeosporioides* y se elaboraron placas de cada uno de los aislados puros (GENPAT, 2009).

Tabla 1. Características macroscópicas de las colonias de *Colletotrichum*. Fuente: GENPAT, 2009.

Color de la colonia: blanco, blanco grisáceo, café oliváceo, crema, gris oscuro, verde oliva.
Borde de la colonia: entero, semiondulado.
Hábito de crecimiento: superficial, superficial/sumergido.
Aspecto del micelio: algodonoso, ralo, semialgodonoso.
Color de la esporulación: crema, naranja, rosa y salmón.

Color del reverso de la colonia: negro, gris, naranja, salmón y crema.
--

4.3 OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

A partir de los aislados de 10 días de crecimiento se obtuvo los cultivos monospóricos para lo cual se usó una pequeña cantidad de masa de conidias llevada a una dilución de 10^{-2} que fue sembrada en cajas petri con medio de cultivo PDA y observadas en microscopio invertido. Se tomaron 4 conidias, se transfirieron a un nuevo medio y se dejaron a temperatura ambiente durante 8 días, después de observar crecimiento se transfirió a un nuevo medio.

4.3.1 Área de crecimiento

A partir de cultivos monospóricos de 8 días de crecimiento se obtuvo inóculos que fueron transferidos a medio de cultivo PDA. Durante 7 días se registró el crecimiento de cada uno de los aislados cada 24 horas mediante fotografías tomadas con cámara Samsung 14.1 MP usando el fondo negro y colocando una regla junto a la caja.

Las fotografías fueron procesadas en el programa ImageJ 1.390 con el fin de calcular el área de crecimiento (Figura 3). Al valor del área obtenido para cada uno de los aislados se le restó el área del inóculo.

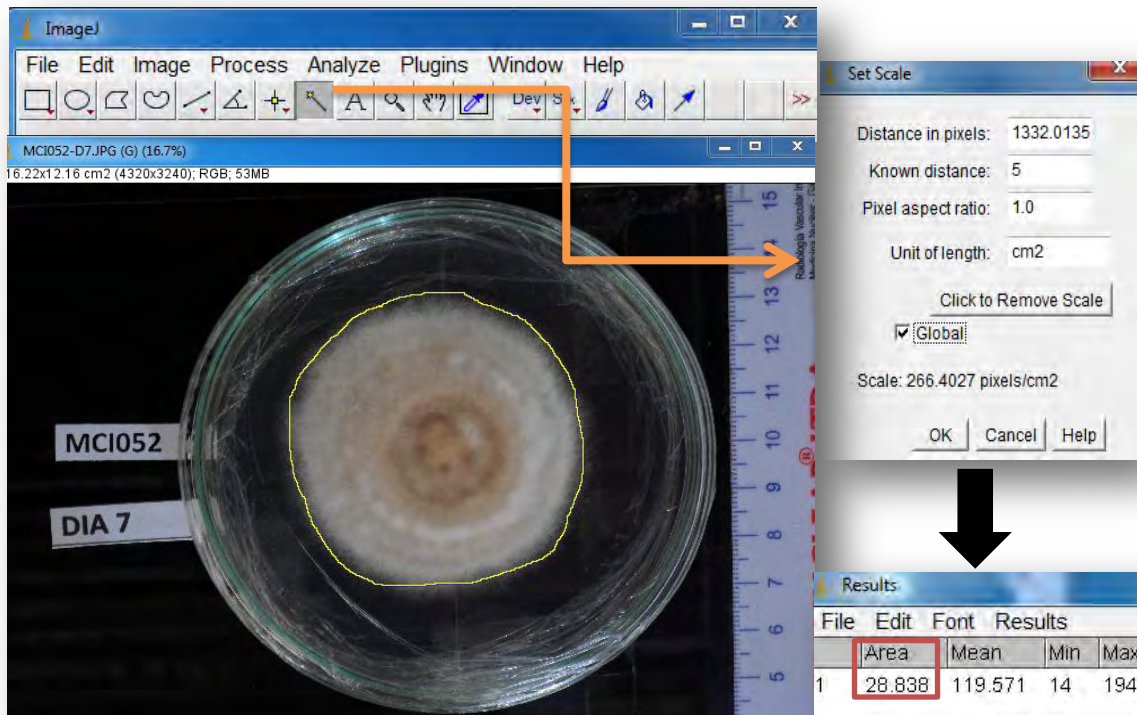


Figura 3. Edición de las imágenes en el programa ImageJ para calcular el área de crecimiento diario de cada una de los aislados. Fuente: ésta investigación.

4.3.2 Descripción Morfológica

Después de los 7 días de incubación y análisis de crecimiento, se determinaron las características macroscópicas categorizadas de la siguiente manera (tabla 2):

Tabla 2. Categorización de las características morfológicas a evaluar. Fuente: GENPAT, 2009.

VARIABLE	CATEGORIA
COLOR DE LA COLONIA FRONTAL	(1)Blanco grisáceo (2)Gris (3)Naranja claro (4)Verde amarillento

	(5)Naranja grisáceo
COLOR DE LA COLONIA REVERSO	(6)Naranja grisáceo (7)Blanco grisáceo (8)Blanco (9)Naranja claro
BORDE DE LA COLONIA	(10) Entero (11) Ondulado (12)Irregular
ASPECTO DEL MICELIO	(13)Algodonoso (14)Ralo
PRESENCIA DE SECTORES	(15)SÍ (16)No
COLOR DE LA ESPORULACION	(17)Naranja (18)Gris

Con la categorización de las diferentes variables se realizó la construcción de un fenograma UPGMA en el programa NTSYS versión 2.0 con el fin de determinar la variabilidad de los caracteres evaluados.

4.4 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Colletotrichum* spp.

4.4.1 Extracción de ADN

Para la obtención ADN de *Colletotrichum* spp. usado en las diferentes pruebas moleculares, se sembró cada aislado monospórico en caldo de papa suplementado con peptona y sacarosa (200g papa, 4g de peptona, 8g sacarosa, 1000ml de agua destilada). De cada aislado se sembraron 10 repeticiones las cuales se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 15 días. Posteriormente el micelio se secó en cámara de flujo y mechero por 7 días (Figura 4), finalmente se procedió a macerar con nitrógeno líquido y almacenar cada micelio en tubos falcon de 50 ml a -20°C (GENPAT, 2009).



Figura 4. Obtención de micelio de *Colletotrichum* para extracción de ADN. A. Apariencia del micelio después de 15 días de crecimiento en caldo de papa. B y C. Secado de micelio. Fuente: ésta investigación.

La extracción de ADN se realizó con el protocolo propuesto por Griffit y Shaw (1998) (modificado):

- Se agregó 800µl de buffer de extracción CTAB (NaCl 1.4M, EDTA pH 8.0 20mM, Tris HCl pH 8.0 100mM, CTAB 2%) más 2 µl de proteinasa K y se incubó en baño maría durante una hora a 65°C.
- Se adicionaron 600 µl de cloroformo y se realizó vortex por diez segundos.
- Se centrifugó a 17000 gravedades por 10 minutos, se tomó 600µl de la fase superior y transfirió a un tubo nuevo.
- Se adicionó 0,6 volúmenes de isopropanol frío (60 por cada 100µl) y se dejó en posición vertical a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se centrifugó a 17000 gravedades por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- El pellet se lavó con un ml de etanol al 70% y se dejó a 65°C durante 20 minutos

- Se centrifugó a 17000 gravedades por diez minutos y se dejó a temperatura ambiente hasta evaporar el etanol.
- Se resuspendió en 50µl de TE 1X, se agregó 3 µl de ARNasa (10 mg/ml) y se digirió durante 3 horas a 37°C.

La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,9% teñido con 3µl de bromuro de etidio (10mg/ml). Las bandas se visualizaron en un Transiluminador (UVP) DyNA Light™ UV.

La pureza y concentración del ADN extraído se determinó mediante la cuantificación por espectrofotometría (NanoDrop 2000C) el cual sugiere que para evaluar con precisión la calidad de la muestra se debe analizar la calidad espectral global a 260/280 nm o 260/230 nm. Los ácidos nucleicos generalmente producen una proporción 260/280 de aproximadamente 1,8 para ADN y 2 para ARN. El índice de pureza del ADN comúnmente se encuentra en el rango 1,8-2,2, si estos niveles son más altos se sugiere la optimización de la técnica de extracción o de las sustancia en la cual se encuentra resuspendido el ADN (Desjardins & Conklin, 2010).

4.4.2 Amplificación de la región ITS

Para la identificación de las especies de *Colletotrichum* se trabajó con los siguientes cebadores Tabla 3:

Tabla 3. Secuencia de nucleótidos de los cebadores a utilizar en la amplificación de las regiones ITS.

cebador	Secuencia (5'->3')	Referencia	Comentario
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990	Cebador universal
CgInt	GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG	Brown <i>et al.</i> , 1996; Martin, <i>et al.</i> , 2002; Afanador <i>et al.</i> , 2003	Cebador específico para <i>C. gloeosporioides</i>
Calnt2	GGGGAAGCCTCTCGCGG	Brown <i>et al.</i> , 1996; Martin, <i>et al.</i> , 2002; Afanador <i>et al.</i> , 2003	Cebador específico para <i>C. acutatum</i>

Para la PCR diagnóstica se utilizó el protocolo propuesto por Álvarez *et al.*, 2005 (Tabla 4), con las siguientes condiciones de amplificación: 25 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 30 segundos (120 segundos para la inicial), 55°C por 30 segundos de apareamiento y una extensión de 120 segundos a 72°C (240 segundos para la final) para todos los cebadores.

Tabla 4. Mezcla para la amplificación de la región ITS.

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

Para visualizar los amplificados se utilizaron geles de agarosa al 1.4% teñidos con bromuro de etidio. Las bandas de los amplificados fueron observadas en un Transiluminador (UVP) marca DyNA Light™ UV.

En cada uno de los protocolos de identificación de las dos especies se usó un control positivo obtenido de la amplificación de ADN de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* proveniente de cepas ya caracterizadas a nivel molecular y facilitadas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y un control negativo de reacción (mezcla maestra sin ADN). Para estimar el tamaño de los productos amplificados se empleó un patrón de peso molecular 100pb ADN Ladder Plus 5 x 50μg marca Fermentas.

4.4.3 Determinación de variabilidad genética mediante marcadores microsatélites RAMs

Para determinar la variabilidad genética de los aislamientos se realizó la amplificación aleatoria con cebadores microsatélites RAMs: CA, ACA, CGA, CCA, AG (Tabla 5). En la PCR se usó el protocolo propuesto por Álvarez *et al.*, en el 2005 (Tabla 6):

Tabla 5. Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la determinación de la variabilidad genética mediante marcadores RAMs.

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'	REFERENCIA
CGA	5'GCGCGACGACGACGACGA 3'	Santacruz, 2013
AG	5'CGCAGAGAGAGAGAGAGA 3'	Álvarez <i>et al.</i> ,
CA	5'GCAACACACACACACACA 3'	2005
ACA	5'CGGACAACAACAACAACA 3'	
CCA	5'AGGCCACCACCACCACCA 3'	

Tabla 6. Mezcla para la amplificación de microsatélites RAMs.

Reactivo	Concentración final
Buffer Taq 10X (100mM de Tris HCl, pH 8.0, 2.5mM MgCl ₂ y 500mM KCl)	1X
dNTPs,	0.2mM
Primer	1.0 mM
MgCl ₂	1.5mM
Taq polimerasa	0.0375U/μL
Agua HPLC	-----
ADN	1ng/μL

Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, y 35 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento para el primer AG 50°C, CCA 55°C, CGA 61°C, ACA 49°C y CA 41°C durante 1 minuto, extensión 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Para visualizar los amplificadores se utilizaron geles de agarosa al 1,7 % teñidos con 5 μl de bromuro de etidio. Las condiciones de electroforesis fueron: 80 voltios, 40 miliamperios por 150 minutos. Se usó un marcador 1K (10.000-250 pb, Fermentas) lo cual permitió dimensionar el tamaño de los amplificadores. El gel se observó en un transiluminador DyNA Light™ UV.

4.4.4 Análisis de datos

Los perfiles de bandas obtenidos a partir de la amplificación con los primers RAMs, se analizaron en el programa Photo Captw vs 10.01. a partir del tamaño de las bandas se generó una matriz binaria de presencia-ausencia (1-0) en el programa EXCEL 2010 de acuerdo al tamaño molecular de cada banda obtenida por cada primer. Posteriormente se realizó una matriz consenso con la información del tamaño de las bandas amplificadas con los dos primers.

En el programa NTSYS v.s 2.11f a partir de la matriz consenso se construyó un dendograma usando el método UPGMA con el coeficiente de similitud Sorenson-DICE. Se eligió este coeficiente por el tamaño de la muestra.

Finalmente a partir de la matriz de similitud consenso mediante el programa GenAlex v.s 2.0 se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para determinar la variabilidad genética total entre y dentro de los grupos relacionados con base en la matriz consenso, además de la diferencia estadística entre las poblaciones Fts de Ipiales y del Encano, la interpretación de los valores de F_{st} se dan en los siguientes rangos: un valor igual a 0, no existe divergencia genética; de 0 a 0,05 la variación es pequeña; de 0,05 a 0,15 es moderada; de 0,15 a 0,25 es grande (Cornell, 2004); y por ultimo valores mayores a 0,25 la variación genética es muy grande; y se calculó el índice de contenido polimórfico, heterocigosidad observada, esperada y riqueza alélica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento de *Colletotrichum* spp.

Todas las muestras fueron seleccionadas de plantas con síntomas de antracnosis observadas en los tallos y ramas como manchas ovaladas de color morado o violáceo que los cubrían parcial o totalmente, algunas plantas también presentaron necrosis al interior de los tallos afectados lo cual corresponde a muerte de tejidos, y los frutos se observaron totalmente momificados (Figura 5). La descripción de estos síntomas concuerda con los datos reportados por Afanador-Kafuri *et al.*, 2014, Saldarriaga *et al.*, 2008, Marulanda *et al.*, 2007, Contreras, 2006; De la-Rotta *et al.*, 2002 en estudios de identificación del agente causal de la antracnosis de mora de castilla en Colombia.



Figura 5. Síntomas de antracnosis en **A.** tallo **B.** ramas y **C.** frutos. Alrededor de las lesiones se puede observar un borde definido de color azul-violeta. En los botones florales y frutos se puede observar necrosis y momificación. Fuente: ésta investigación.

5.2. Caracterización fenotípica de los aislados de *Colletotrichum* spp.

En total se colectaron 80 muestras de las cuales 43 resultaron positivas para *Colletotrichum* spp., 23 procedentes del corregimiento el Encano y 18 del municipio de Ipiales. El porcentaje de aislamiento fue del 51,25% un valor bajo debido al alto grado de contaminación en el medio de cultivo por hongos del género *Penicillium* y en las muestras obtenidas a partir de frutos por la presencia de bacterias tipo *Pseudomonas* las cuales se asocian a especies del género *Colletotrichum* ayudando a estimular la germinación y formación de apresorios del hongo, a través de la emisión de sustancias quelantes que favorecen los procesos de infección (Saldarriaga, 2008 y Botero, 2002).

De los aislados de *Colletotrichum* spp. de mora de castilla del corregimiento el Encano, 20 presentaron micelio blanco grisáceo, reverso de la colonia naranja grisáceo y blanco grisáceo, aspecto del micelio algodonoso, con borde entero, sin presencia de sectores y esporulación color naranja. Solo tres presentaron color del reverso blanco y bordes irregulares (Figura 6A, B y C). En 15 aislados los conidios presentaron extremos redondeados (cilíndrico) y ocho conidios falcados (figura 7).

Los aislados del municipio de Ipiales presentaron la siguiente morfología: colonias de color blanco grisáceo, con reverso blanco, borde entero, micelio ralo y esporulación color gris (Figura 6 D, E y F). En todos los aislados la forma de los conidios fue cilíndrico (Figura 7).

Estas características posiblemente corresponden con el tipo morfológico de *C. gloeosporioides* descrito por Contreras (2006) como un hongo que forma colonias blancas al inicio de su crecimiento que luego se tornan de color gris y en la superficie inferior son de color rosado o carmín, masas conidiales de color rosado a naranja, sin embargo, Lewis *et al.*, 2004 también reporta estas características para *C. acutatum* incluyendo el color salmón de la esporulación y conidios cilíndricos.

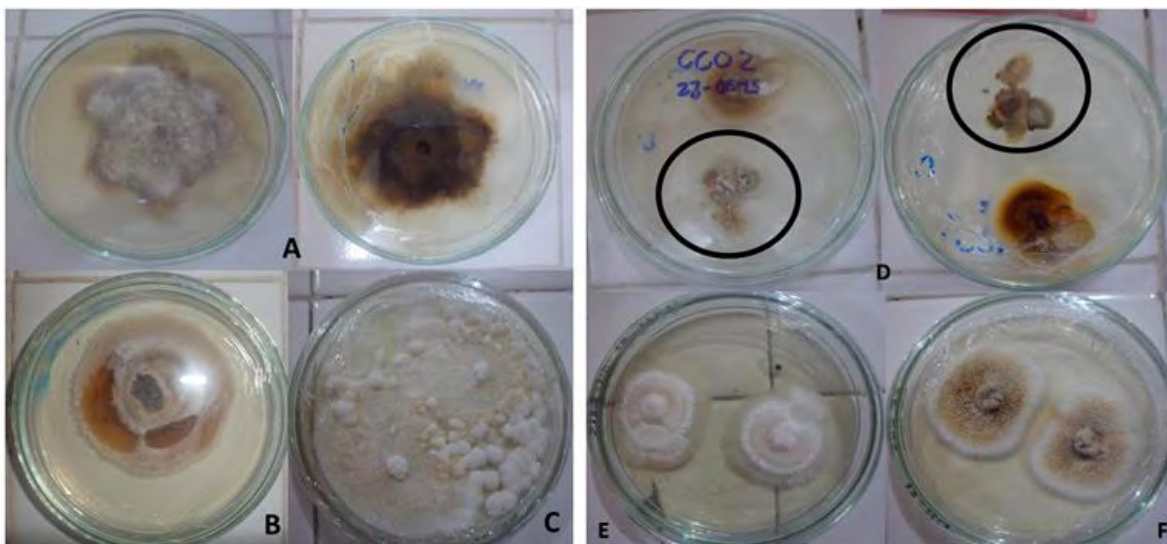


Figura 7. Crecimiento de los aislados a partir de los tallos de mora de castilla después de 10 días de crecimiento. **A, B y C.** Colonias puras de aislados de *Colletotrichum* en medio PDA, procedentes del corregimiento El Encano. **D, E y F.** Colonias puras de los aislados de *Colletotrichum* procedentes del municipio de Ipiales. Fuente: ésta investigación.

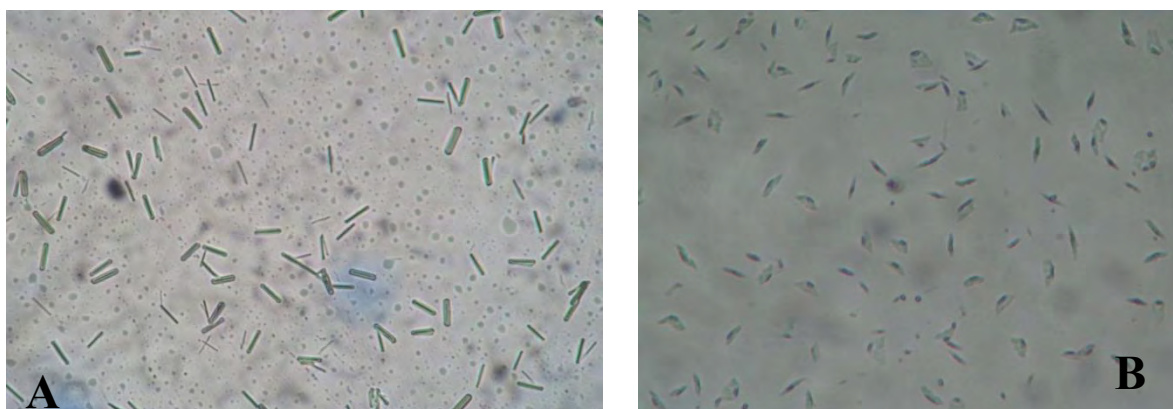


Figura 6. Conidios de *Colletotrichum* spp. del aislado **A.** MCI075 correspondiente al municipio de Ipiales y **B.** MCE005 correspondiente al corregimiento El encano. Fuente: ésta investigación.

El fenograma de agrupamiento de todos los aislados del Corregimiento el Encano y del municipio de Ipiales (Figura 8) indica la formación de 11 grupos.

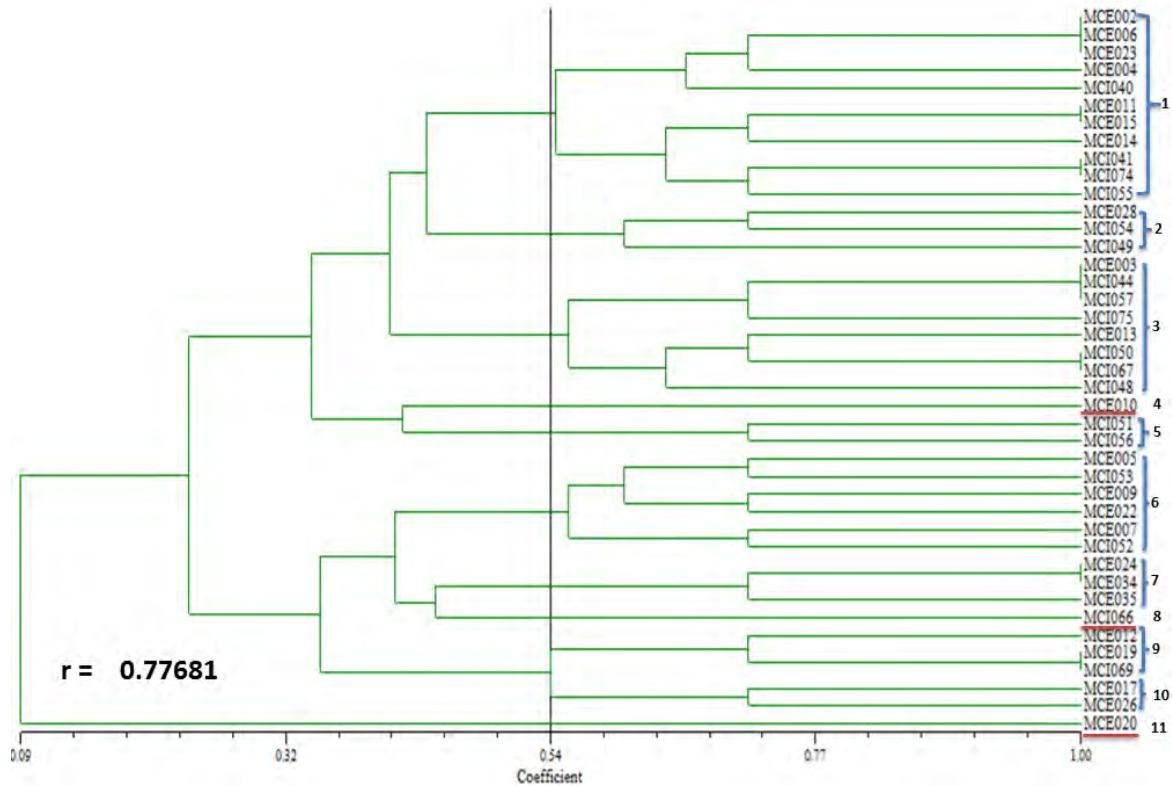


Figura 8. Fenograma de los aislados de *Colletotrichum* spp. procedentes del corregimiento El Encano (MCE) y del municipio de Ipiales (MCI). Fuente: ésta investigación.

El grupo 1: se caracteriza por presentar color de la colonia frontal blanco y naranja grisáceo, reverso blanco, cuatro aislados presentaron borde entero y siete borde ondulado, aspecto del micelio algodonoso, sin presencia de sectores y esporulación color gris y conidios cilíndricos. (Figura 9.1).

El grupo 2: color de la colonia frontal y reverso blanco grisáceo, borde ondulado, micelio algodonoso, presenta sectores, esporulación es de color gris y conidios cilíndricos (Figura 9.2).

El grupo 3: color de la colonia frontal gris y naranja grisáceo, reverso blanco grisáceo, el borde de la colonia es entero, el aspecto del micelio ralo y algodonoso, no presenta sectores y esporulación de color gris, siete aislados presentaron conidios cilíndricos y uno presentó conidios falcados (figura 9.3).

El grupo 4: color de la colonia frontal naranja grisáceo y reverso naranja, con borde irregular, aspecto del micelio algodonoso, no presenta sectores, el color de la esporulación es gris y posee conidios falcados (Figura 9.4).

El grupo 5: color de la colonia frontal blanco y reverso naranja, borde irregular, micelio algodonoso sin presencia de sectores, color de la esporulación gris y conidios cilíndricos (Figura 9.5).

El grupo 6: parte frontal de la colonia color blanco grisáceo, gris y naranja grisáceo, reverso de la colonia es color naranja, borde entero y ondulado, micelio algodonoso, no presenta sectores, esporulación color naranja, dos aislados presentaron conidios falcados y cuatro cilíndricos (Figura 9.6).

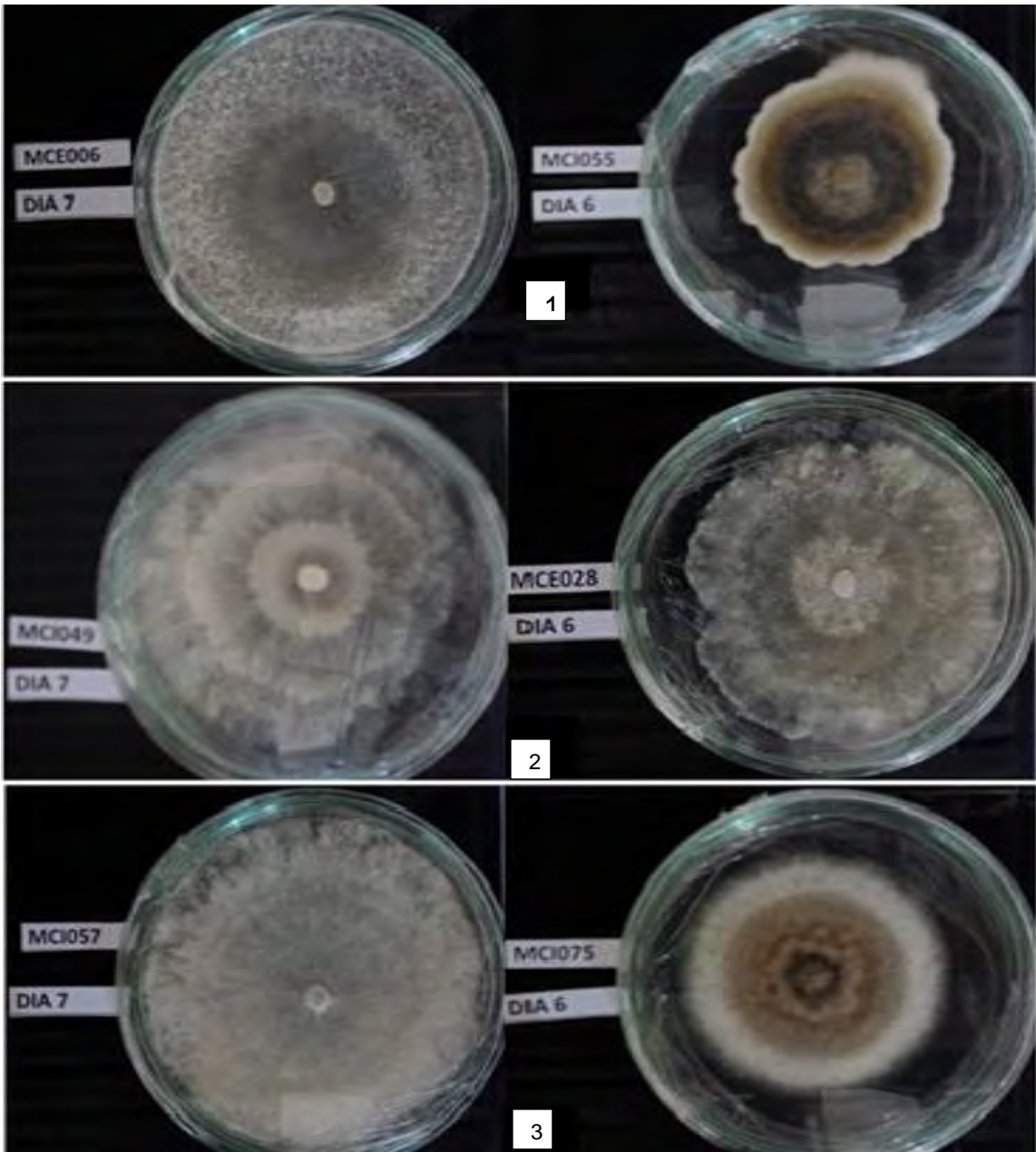
El grupo 7: color de la colonia frontal blanco y reverso naranja, borde entero, micelio algodonoso sin presencia de sectores y esporulación color naranja, dos aislados presentaron conidios falcados y uno cilíndrico (Figura 9.7).

El grupo 8: color de la colonia frontal y reverso naranja, borde entero, micelio ralo sin presencia de sectores, esporulación color naranja y conidios cilíndricos (Figura 9.8).

El grupo 9: color de la colonia frontal y reverso naranja claro, borde entero, micelio ralo, sin presencia de sectores, esporulación color naranja, dos aislados presentaron conidios cilíndricos y uno falcados. (Figura 9.9).

El grupo 10: color de la colonia frontal y reverso blanco, blanco grisáceo y naranja claro, borde de la colonia entero, sin presencia de sectores, micelio algodonoso y ralo, esporulación color naranja, un aislado presentó conidios falcados y uno cilíndricos. (Figura 9.10).

El grupo 11: color de la colonia frontal y reverso naranja claro, borde entero, micelio algodonoso, sin presencia de sectores y esporulación naranja y conidios cilíndricos (Figura 9.11).



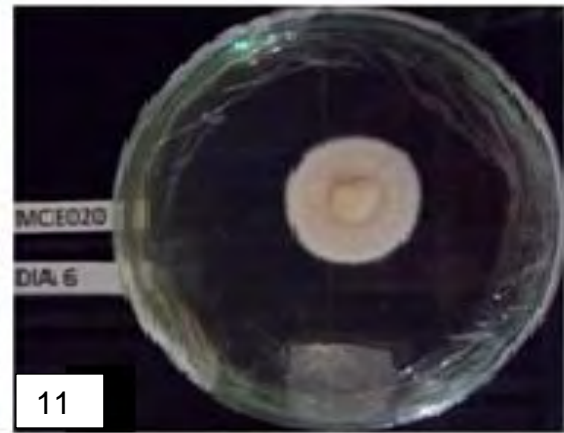
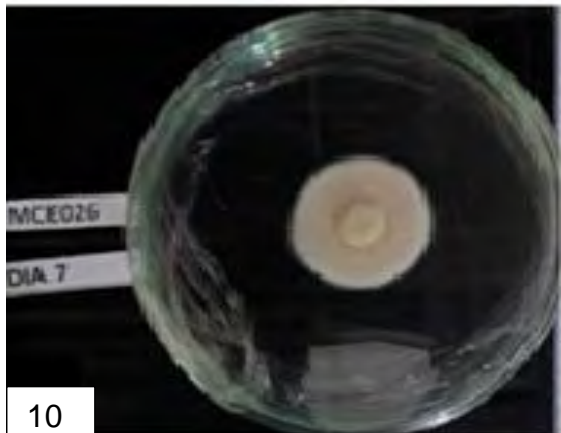
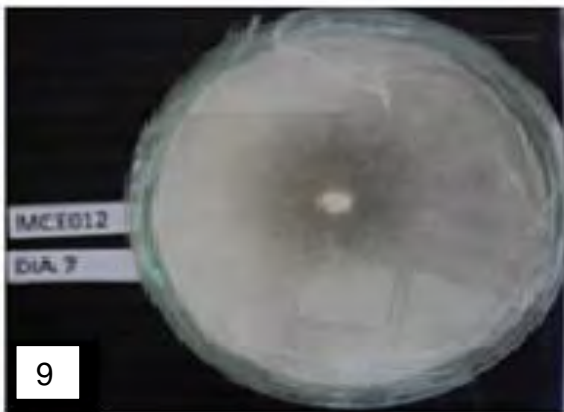
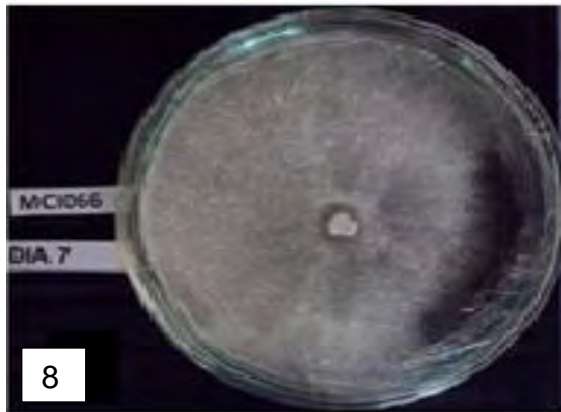
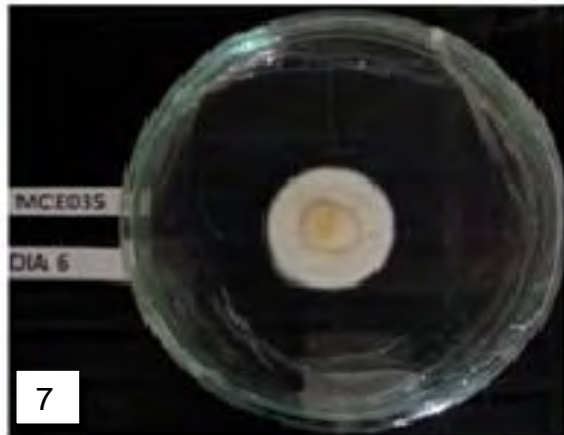
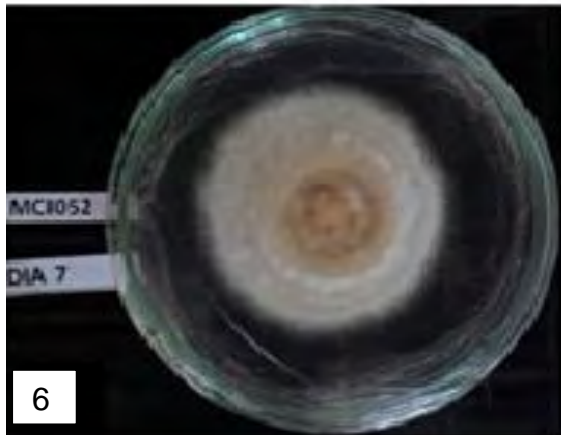
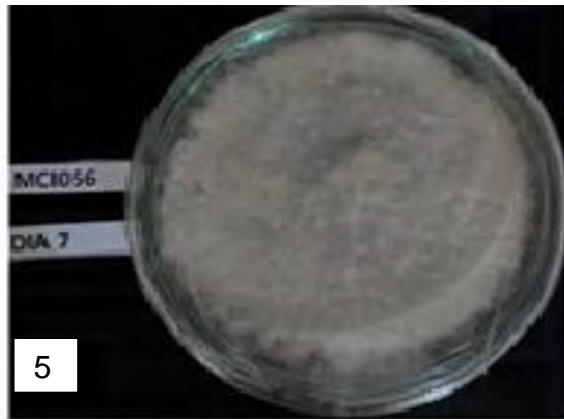
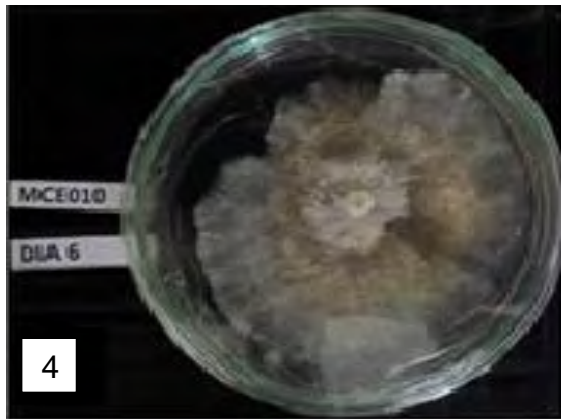


Figura 9. Descripción morfológica de los aislados de *Colletotrichum* spp. procedentes de mora de castilla de cultivos ubicados en el corregimiento El Encano y del municipio de Ipiales. Cada una de las imágenes representa a un aislado de cada grupo formado en el fenograma. 1. color de la colonia frontal blanco y naranja grisáceo, reverso blanco, cuatro aislados presentaron borde entero y siete borde ondulado. 2. color de la colonia frontal y reverso blanco grisáceo, borde ondulado, micelio algodonoso con presencia de sectores. 3. colonia frontal gris y naranja grisáceo, reverso blanco grisáceo, borde entero, micelio ralo y algodonoso, no presenta sectores. 4. color de la colonia frontal naranja grisáceo y reverso naranja, con borde irregular, aspecto del micelio algodonoso, no presenta sectores. 5. colonia frontal blanco y reverso naranja, borde irregular, micelio algodonoso sin presencia de sectores. 6. parte frontal color naranja grisáceo, reverso color naranja, borde entero, micelio algodonoso, no presenta sectores. 7. colonia frontal blanco y reverso naranja, borde entero, micelio algodonoso sin presencia de sectores. 8. color de la colonia frontal y reverso naranja, borde entero, micelio ralo, sin presencia de sectores. 9. colonia frontal y reverso blanco, borde entero, micelio algodonoso, sin presencia de sectores. 10. colonia frontal y reverso naranja claro, borde entero, sin presencia de sectores, micelio algodonoso. 11. color de la colonia frontal blanco y reverso naranja claro, borde entero, micelio algodonoso, sin presencia de sectores. Fuente: ésta investigación.

Las características morfológicas anteriormente descritas coinciden con las descripciones realizadas por Afanador-Kafuri *et al.*, 2014, Saldarriaga *et al.*, 2008 Marulanda *et al.*, 2007, Contreras, 2006; De la-Rotta *et al.*, 2002 en aislados procedentes de mora de castilla.

Según lo reportado por Afanador-Kafuri *et al.*, 2014; Contreras, 2006 y Álvarez *et al.*, 2005, el color de la esporulación gris corresponde a la especie *C. gloeosporioides* y naranja, rosado o salmón a la especie *C. acutatum*, sin embargo Tous 2008, reporta esporulaciones gris, naranja y salmón de *Colletotrichum* aislado de ñame para *C. gloeosporioides*.

La alta variabilidad de las características morfológicas no es concluyente para identificar el patógeno a nivel de especie ya que factores como medio de cultivo, edad de la colonia y procedencia del hospedero inciden en el fenotipo del hongo. De esta manera la descripción de las características anteriores solamente permitió corroborar que los aislados procedentes de mora de catilla del municipio de Ipiales y del corregimiento El Encano corresponden al género *Colletotrichum*.

5.2.1 Área de crecimiento

El área de crecimiento se evaluó en 41 de los 43 aislados de *Colletotrichum* debido a que dos presentaron problemas de contaminación.

Los aislados del corregimiento el Encano alcanzaron un área máxima de crecimiento de 58 cm² y una mínima de 9 cm². En la figura 11 se observa que solo 7 de los 23 aislados después de los siete días de evaluación presentaron crecimiento por encima de los 20 cm² llegando hasta cubrir el área de la caja Petri (60 cm²), 16 aislados alcanzaron crecimiento máximo de 12 cm².

Los aislados del municipio de Ipiales presentaron un área de crecimiento máxima de 59 cm² y una mínima de 25 cm² después de los siete días de seguimiento. En la figura 12 se puede notar que a partir del tercer día de evaluación ya se encuentran aislados con áreas de crecimiento superiores a 20 cm², a diferencia de los aislados del corregimiento El Encano que presentaron áreas de crecimiento inferiores.

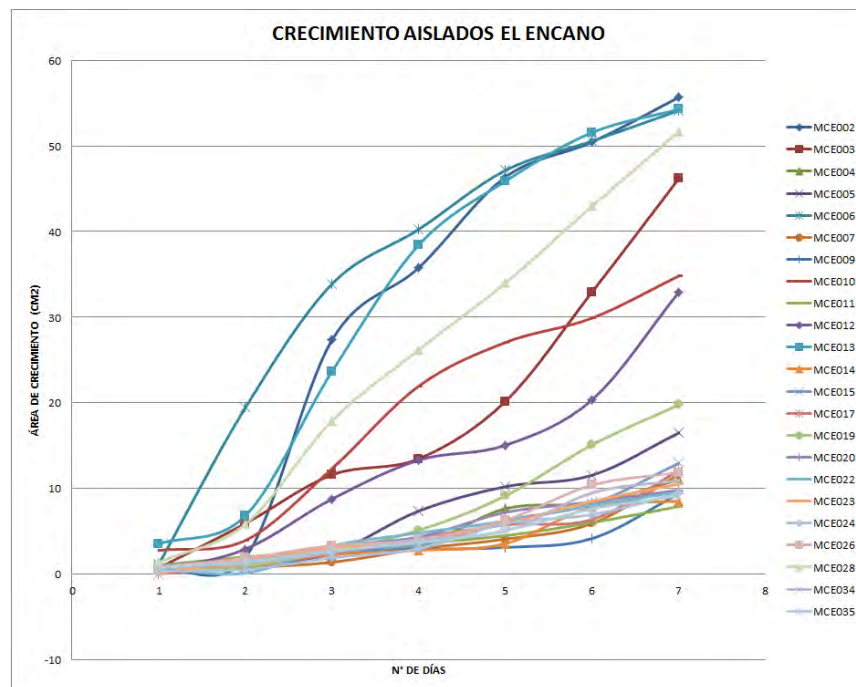


Figura 10. Curva de crecimiento de los aislados de mora de castilla procedentes del corregimiento el Encano. Fuente: ésta investigación.

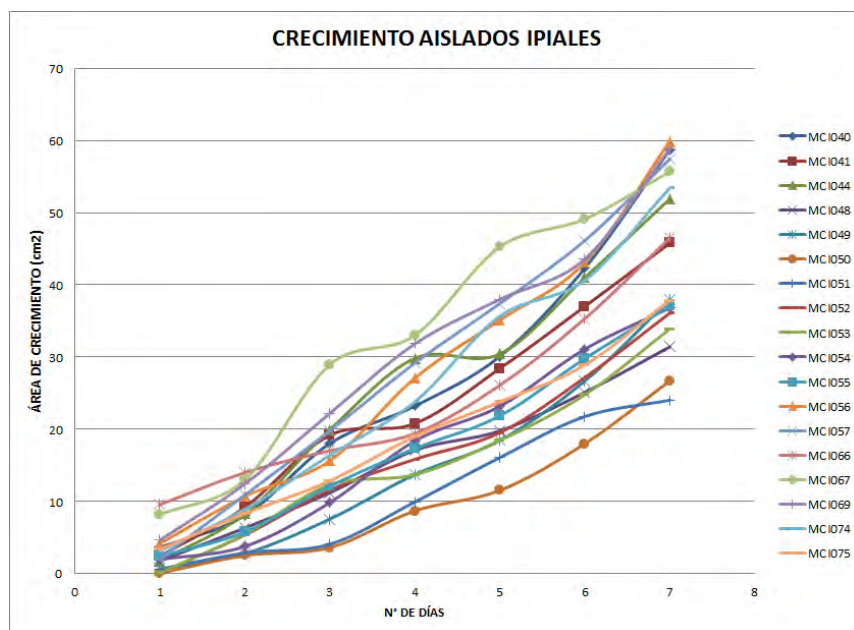


Figura 11. Curva de crecimiento de aislados de mora de castilla procedentes del municipio de Ipiales. Fuente: ésta investigación.

La tasa de crecimiento y las relaciones de temperatura han sido usadas para discriminar entre *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, claro está dependiendo de las condiciones ambientales donde se desarrolla el hospedero además de las condiciones in vitro como medio de cultivo y temperatura de incubación (Santacruz, 2013; Domínguez et al., 2012; Morales et al., 2009; Harp et al., 2008; Contreras, 2006).

5.3 CARACTERIZACION GENOTÍPICA

5.3.1 Extracción de ADN

Se seleccionaron al azar 30 aislados de *Colletotrichum* spp. procedentes de mora de castilla 15 del corregimiento el Encano y 15 del municipio de Ipiales, los cuales después de realizar el proceso de extracción y cuantificación de ADN presentaron alta pureza y concentración. Con el protocolo de extracción de ADN propuesto por Griffit y Shaw (1998) con modificaciones, el ADN obtenido fue de buena calidad ya que solo se evidencia una banda bien definida (Figura 13) indicando que no hay contaminantes como ARN o restos de proteínas. Aquellas muestras que presentaron barridos (por ejemplo MCI050 y MCI042) fueron incubadas nuevamente con RNAasa durante dos horas con el fin de purificarlas.

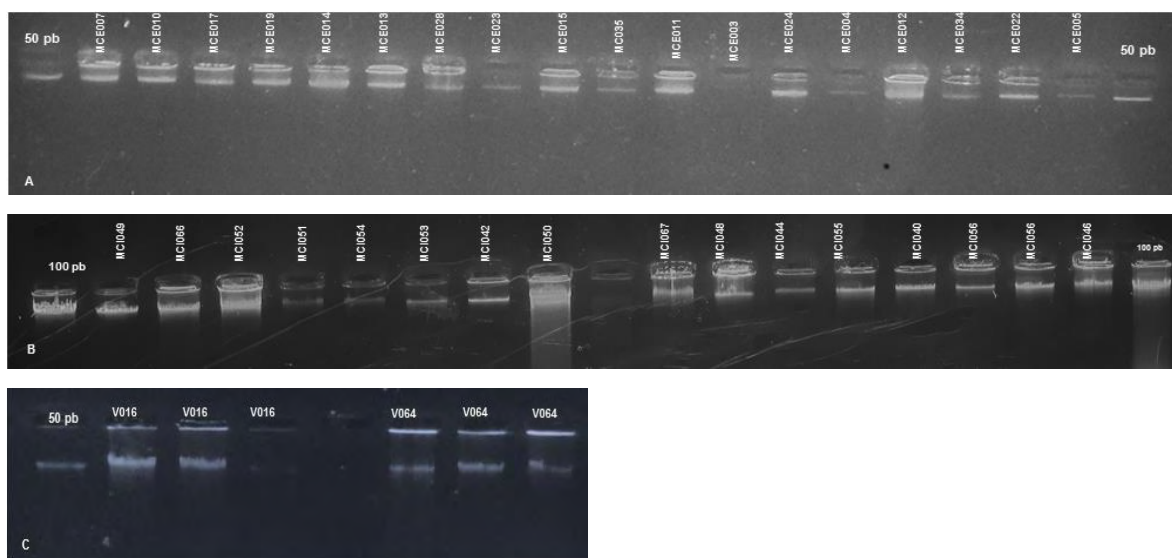


Figura 12. Gel de electroforesis en agarosa al 0,9% del ADN de los aislados de *Colletotrichum* spp. de mora de castilla procedentes A. del corregimiento El Encano, B. del municipio de Ipiales y C. de los controles positivos para las especies *C. acutatum* (V064) y *C. gloeosporioides* (V016). Fuente: ésta investigación.

En este estudio se obtuvo concentraciones de ADN entre 30 y 350 ng con relaciones de absorbancia 260/280 entre 1,7 y 1,9 (Anexo 3) lo cual indica que el ADN extraído es puro, según lo reportado por Desjardins & Conklin, 2010, quienes afirman que la relación de

absorbancia 260/280 debe estar entre 1,8 y 2,2. Aquellas muestras que presentaron concentraciones superiores a 500 ng y relación de absorbancia 260/280 superior a 2,2 fueron nuevamente extraídas ya que según Desjardins & Conklin, 2010 estos valores se pueden presentar debido a contaminantes como el cloroformo lo cual afecta los espectros de las muestras de ADN.

5.3.2. Optimización del protocolo de amplificación de la región ITS

Para optimizar el proceso se probaron cuatro concentraciones de ADN: 10, 15, 20 y 40 ng/ μ l de los cuales 20 ng fue la concentración adecuada.

Para *C. gloeosporioides* se hizo un gradiente de temperaturas de alineamiento y se decidió trabajar con las condiciones reportadas por Afanador-Kafuri *et al.*, 2014, quien sugiere realizar una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 62°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 90 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de amplificación fueron observados en gel de agarosa al 1,4% teñidos con bromuro de etidio (Figura 13).

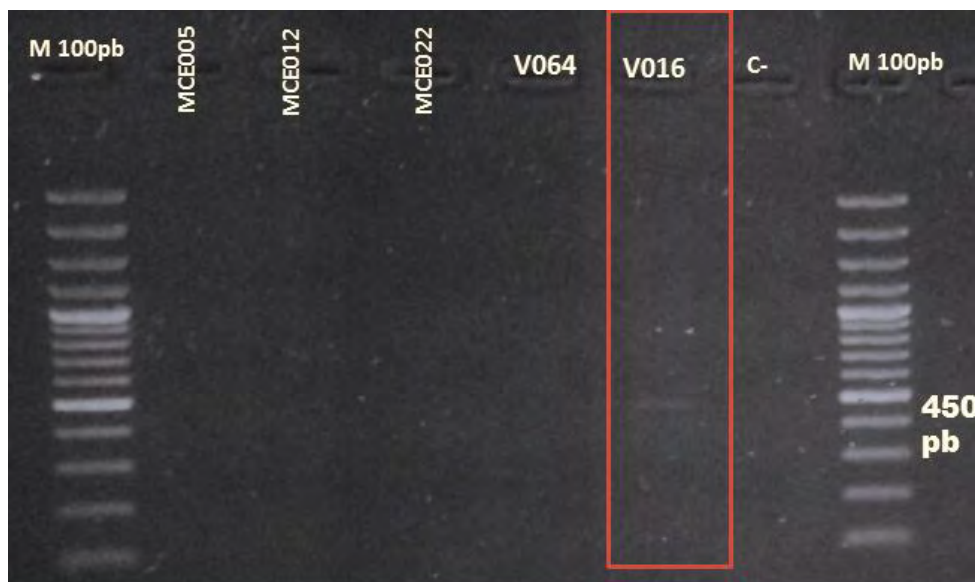


Figura 13. Amplificación de 3 aislados de *Colletotrichum* spp. más un control positivo para *C. gloeosporioides* (V016) y uno para *C. acutatum* (V064) usando los primers Cglnt + ITS4 bajo condiciones reportadas por Afanador-Kafuri et al., 2014. Fuente: ésta investigación.

Estos resultados sugieren tener en cuenta la temperatura de alineamiento de cada primer que depende de su longitud y composición de su secuencia de generando valores son específicos. En este caso las temperaturas de alineamiento óptimas para cada primer fueron de 55°C para *C. acutatum* y 62°C para *C. gloeosporioides*.

5.3.3. Amplificación de la región ITS

El ADN de los 30 aislados más dos controles positivos para *C. acutatum* (V064) y *C. gloeosporioides* (V016) fueron amplificados usando los cebadores específicos para *C. acutatum* (Calnt2) y *C. gloeosporioides* (Cglnt) más el cebador universal ITS4, obteniéndose un fragmento de ADN de 490 pb con los primers Calnt2 + ITS4 y de 450 pb con los primers Cglnt2 + ITS4.

15 aislados procedentes del municipio de Ipiales y siete del corregimiento El Encano fueron positivos para *Colletotrichum acutatum*; y los 8 aislados restantes del corregimiento El Encano no presentaron amplificación con los primers específicos (Figura 14).

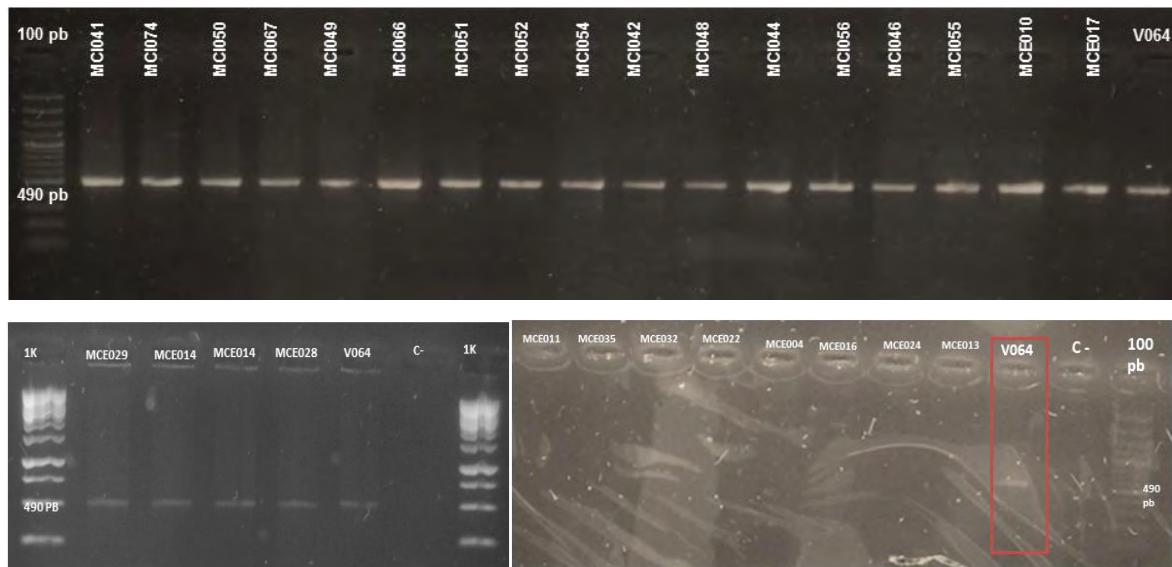


Figura 14. Geles de amplificación de ADN de los aislados de *Colletotrichum* spp. procedentes del corregimiento El Encano (MCE) y del municipio de Ipiales (MCI) con cebadores específicos para *C. acutatum* (Calnt2+ITS4). Fuente: ésta investigación.

Se realizó nuevamente la PCR usando los 8 aislados negativos para *C. acutatum* con el primer específico para *C. gloeosporioides*. Finalmente después de realizar la verificación de los amplificadores en gel de agarosa se concluye que ninguno de los aislados corresponde a la especie *C. gloeosporioides* ya que solo amplificó el control positivo para esta especie (Figura 15).



Figura 15. Gel de verificación de la amplificación de 8 aislados de *Colletotrichum* spp. procedentes del corregimiento El Encano más un control positivo para *C. gloeosporioides* con los primers CgInt +ITS4. Fuente: ésta investigación.

Los cebadores específicos para estas dos especies se han usado desde el año 2000 con el fin de identificar a nivel de especie al agente causal de la antracnosis en varios hospederos (Afanador-Kafuri *et al.*, 2014; Álvarez S. 2013; Santacruz C. 2013; Saldarriaga *et al.*, 2008; Rodríguez 2007; Cadavid *et al.*, 2007; Lizarazo P. 2005; Álvarez *et al.*, 2005; Talhinhos *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 2001; Freeman *et al.*, 2000).

Es evidente la presencia de *C. acutatum* como agente causal de la antracnosis en cultivos de mora de castilla procedentes del municipio de Ipiales y corregimiento El Encano, estos datos coinciden con los reportados por Afanador-Kafuri *et al.*, 2014, Saldarriaga *et al.*, 2008, Marulanda *et al.*, 2007, Contreras, 2006; De la-Rotta *et al.*, 2002. No obstante es urgente avanzar en el proceso de caracterización molecular de los 8 aislados indeterminados, a través de secuenciación para identificar que otra especie está infectando estos cultivos; ésta investigación descarta las dos especies probadas *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* pero es importante considerar que Afanador-Kafuri *et al.*, 2014 también reporta a *C. boninense* como agente causal de la enfermedad.

5.3.4 Optimización del protocolo para amplificación con primers RAMs

Para la optimización del protocolo de amplificación para RAMs se utilizaron los cinco primers seleccionados (CCA, AG, CGA, CA y ACA), los cuales se probaron con dos concentraciones de ADN diferentes 10 y 20 ng, obteniendo resultados positivos con la concentración de 20 ng solo para los primers CGA y AG (Figura 16). Con una concentración de ADN a 10 ng no se logró amplificación con ninguno de los primers debido probablemente a que, como lo reporta Dorado *et al.*, (2006), concentraciones superiores a 50 ng o inferiores a 10 ng en el mix pueden inhibir la reacción debido a que el tamaño del ADN diana y su peso deben estar en proporción directa, es decir, a menor tamaño menos peso y menor volumen en el mix de reacción.

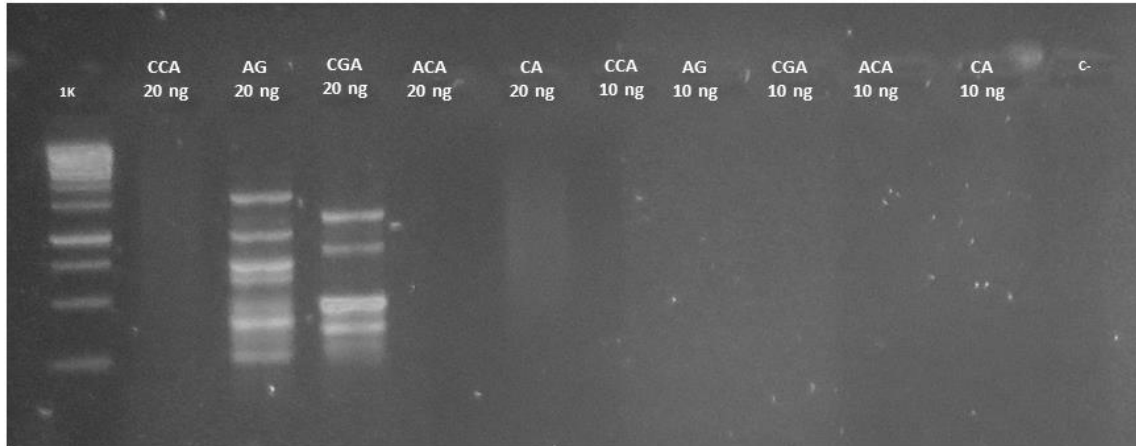


Figura 16. Gel de amplificación con los primers CCA, AG, CGA, CA y ACA con dos concentraciones de ADN. Fuente: ésta investigación.

Teniendo en cuenta que con los primers CA, CCA y ACA no se logró ninguna amplificación y que uno de los factores que más incide en este tipo de resultados es la temperatura de fusión o alineamiento (T_m) puesto que depende de factores como la longitud y secuencia de los primers y exige para cada uno estudios experimentales para determinar su temperatura de hibridación específica ya que si ésta es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa (Velasco, 2004), se realizó una prueba con gradiente de temperatura de alineamiento para el primer CA a 39°C, 41°C y 43°C, ACA a 47°C, 49°C y 51°C, y por último CCA a 53°C, 55°C y 57°C, sin embargo no se obtuvo resultados positivos por tanto se seguirán realizando pruebas con otros gradientes de temperatura y modificando algunas de las concentraciones de los reactivos utilizados en el mix como lo propone Santacruz (2013).

5.3.5 Determinación de la variabilidad genética

Con los dos primers polimórficos se determinó la variabilidad genética de 30 aislados de *Colletotrichum* procedentes de mora de castilla, 15 del corregimiento el Encano y 15 del municipio de Ipiales, más dos controles positivos para las especies *C. gloeosporioides* (V016) y *C. acutatum* (V064) generando un patrón de 126 bandas para los aislados del municipio de

Ipiales con tamaños moleculares entre 3000 y 250 pb y 145 bandas para los aislados del corregimiento El Encano con tamaños moleculares entre 3000 y 400 pb (Figura 17).

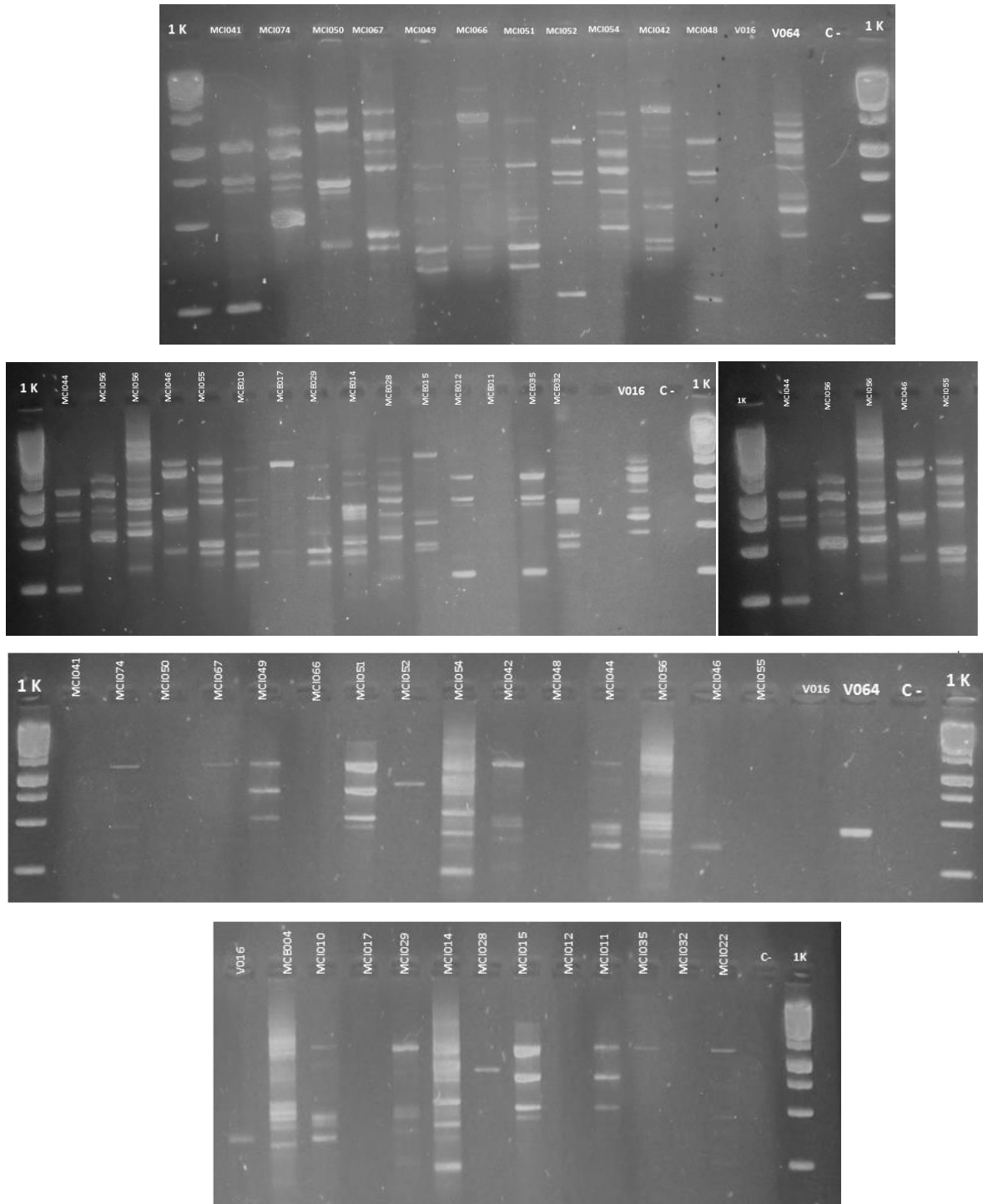


Figura 17. Patrón de bandas obtenidas para los 30 aislados de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum* spp. y los controles positivos para *C. gloeosporioides* (V016) y *C. acutatum* (V064), mediante los primers RAMs AG y CGA. Fuente: ésta investigación.

Para los análisis de variabilidad se realizó una matriz consenso con el fin de determinar las bandas polimórficas (Tabla No 6). A partir de estos datos se calculó la frecuencia alélica, heterocigosidad y porcentaje de loci polimórficos para la población (Tabla 7), además se construyó el dendograma de agrupamiento con el índice Sorenson-Dice con el fin de determinar la distribución de los aislados (Figura 18) y finalmente se realizó el análisis de varianza molecular (Tabla 8).

Para el análisis sólo se consideraron aquellas bandas que fueron capaces de ser distinguibles como presentes o ausentes dadas las condiciones propias de cada gel, tomándose como idénticas las bandas del mismo tamaño molecular. La intensidad de las bandas no fue considerada un factor polimórfico como lo sugiere Luna y colaboradores (2003). Se determinó como banda polimórfica aquella presente en una frecuencia mayor al 1 % y menor al 100 %, y como banda no polimórfica la presente en todos los patrones génicos (frecuencia del 100 %) (Luna *et al.*, 2003). Se encontró un alto polimorfismo en los sitios de estudio, para el corregimiento El Encano del 91,26% y para el municipio de Ipiales del 88,27%. La heterocigosidad observada en la población fue de 0,578 y la riqueza alélica de 9,17 indicando un nivel intermedio de heterocigosidad ya que los valores de referencia oscilan entre 0 y 1, es importante tener en cuenta que este valor estima la probabilidad, en organismos con cruzamiento al azar, de que dos alelos escogidos en una población sean diferentes. Sin embargo, no refleja exactamente la cantidad de variación genética en las poblaciones de organismos que se reproducen asexualmente o por autofecundación (Ayala, 1982; Frankham *et al.*, 2009) por lo tanto es necesario complementar esta información con estadísticos como la AMOVA.

Tabla 7. Frecuencia de bandas polimórficas obtenidas de los aislados de *Colletotrichum acutatum* y de *Colletotrichum* spp. de Ipiales y El Encano mediante microsátélites RAMs.

SITIO DE ESTUDIO	BANDAS TOTALES	BANDAS POLIMÓRFICAS	%	Loci polimórficos
EL ENCANO	126	115	91,26%	

IPIALES	145	128	88,27%
----------------	-----	-----	--------

Tabla 8. Parámetros de diversidad genética de *C. acutatum* y *Colletotrichum* spp

POBLACIÓN	N	A	H₀	He	P
IPIALES Y EL ENCANO	30	9,17	0,578	0,698	93,15%

N: número de individuos analizados, **A:** número medio de alelos por locus, **H₀** Heterocigosidad observada, **He:** heterocigosidad esperada. **P.** porcentaje de loci polimorficos.

El análisis de varianza molecular para los dos sitios de estudio mostró una variación del 84,74% dentro de las poblaciones y 15,26% de variabilidad entre las poblaciones (Tabla 8), a pesar de que *Colletotrichum* se reproduce asexualmente en la naturaleza; no obstante cabe aclarar que a nivel de laboratorio si se ha evidenciado reproducción sexual, hecho que no permite descartar este proceso en campo (Talgo *et al.*, 2007). Estos resultados coinciden con los datos reportados por Santacruz, 2013 (90%); Álvarez, 2013 (95,77%); Álvarez *et al.*, 2005 en donde describen a *C. acutatum* como un hongo altamente variable intraespecíficamente debido a la presencia de procesos como mutación, recombinación, heterocariosis, parasexualidad y flujo génico.

Tabla 9. Resumen del análisis de varianza molecular de las poblaciones de *C. acutatum* y *Colletotrichum* spp. de Ipiiales y El Encano.

Fuente de variación	de gl	Suma de cuadrados	de Componentes de varianza	% de variación
Entre poblaciones	1	0,804	0,06112 Va	15,26
Dentro de las poblaciones	32	11,079	0,48155 Vb	84,74
Total	33	11,880	0,54267	100

Índice	de	Fst=0,15762	P 0,000
fijación			

Teniendo en cuenta que los aislados fueron procedentes de tres variedades de mora de castilla (fresa, sin espinas y con espinas), las plántulas de estas variedades son altamente distribuidas por los agricultores en las zonas productoras debido al gran tamaño de los frutos y rendimiento por planta cultivada, lo que incrementa la difusión del patógeno. En conversaciones con los agricultores en el corregimiento El Encano, afirmaron que las plantas de mora variedad fresa y sin espinas fueron adquiridas del municipio de Ipiales y de acuerdo a los datos obtenidos en este estudio los seis aislados identificados como *C. acutatum* procedentes del Encano fueron aislados de plantas de estas dos variedades.

Por otro lado, las mutaciones son un factor importante como fuente de variación genética en las poblaciones de hongos fitopatógenos, la intensidad con que una mutación puede alterar la diversidad de la población depende de la tasa de mutación, nivel de ploidía del organismo, tamaño de la población y las ventajas adaptativas del fenotipo mutante (Rasmussen *et al.*, 1993). El rango de las mutaciones por locus es generalmente bajo, si la mutación es persistente y sobre un tiempo genera alta variabilidad que es preservada en todos los loci. Las mutaciones espontaneas de avirulencia es reconocido como un medio por el cual las poblaciones naturales de un amplio rango de hongos responde a cambios en la resistencia de las poblaciones de su hospedero (Burdon, 1993).

La recombinación o el tipo de reproducción sexual, asexual o una combinación de las dos también incrementa la diversidad genética en las poblaciones permitiendo la formación de nuevas composiciones genéticas. En muchos casos la reproducción asexual es baja pero ocurre más frecuente que la sexual por esta razón un número limitado de clones o líneas clonales son diseminados a través de un rango geográfico mundial (Mc Donald *et al.*, 1999).

Wharton & Diéguez, 2004 afirman que en hongos filamentosos como *C. acutatum* la fusión de hifas o anastomosis entre cepas compatibles permite el intercambio de material

genético, aclarando que cuando la anastomosis ocurre entre cepas incompatibles se produce muerte de las hifas fusionadas.

El dendograma indica la formación de 10 grupos (Figura 18): 1, 2, 3, 4, 8 y 9 se encuentran los aislados identificados como *C. acutatum* y el control positivo para esta especie V064, el cual se encuentra dentro del grupo 4. Los aislados no identificados a nivel de especie se encuentran en los grupos 5, 6, 7 y 10 (Figura 18). No se pudo observar un patrón de agrupamiento según la localidad de origen del patógeno que concuerda con los resultados de varianza molecular y se debe principalmente al flujo de genes y a la presión de selección ejercida por el uso continuo de moléculas químicas principalmente de acción protectante y/o sistémica utilizadas en el manejo de la enfermedad. Estudios recientes han demostrado que la presencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para las proteínas blanco de la acción fungicida y de secuencias específicas de nucleótidos de las regiones promotoras de dichos genes, se encuentran asociadas con la aparición de fenotipos resistentes a diversas moléculas químicas en organismos fitopatógenos (Damicone, 2004).

La resistencia a fungicidas se manifiesta como una variación genética en un hongo que resulta en la reducción de su sensibilidad a una molécula química, debido a la disminución en la tasa de ingreso del fungicida a las células del patógeno, la falta de afinidad química con su molécula blanco o la detoxificación del compuesto por parte del hongo. Estos cambios generalmente se encuentran asociados con la presencia de mutaciones genéticas que ocurren en forma natural o inducida como resultado de una alta presión de selección ejercida por la molécula química (Koller, 2000; Damicone, 2004). Dichas mutaciones pueden aparecer en uno o varios genes, dependiendo del modo de acción del fungicida. La resistencia a los fungicidas que actúan sobre un único sitio específico, tiene más probabilidades de ocurrir debido a que sólo es necesaria la generación de mutaciones puntuales sobre un solo gen (Damicone, 2004).

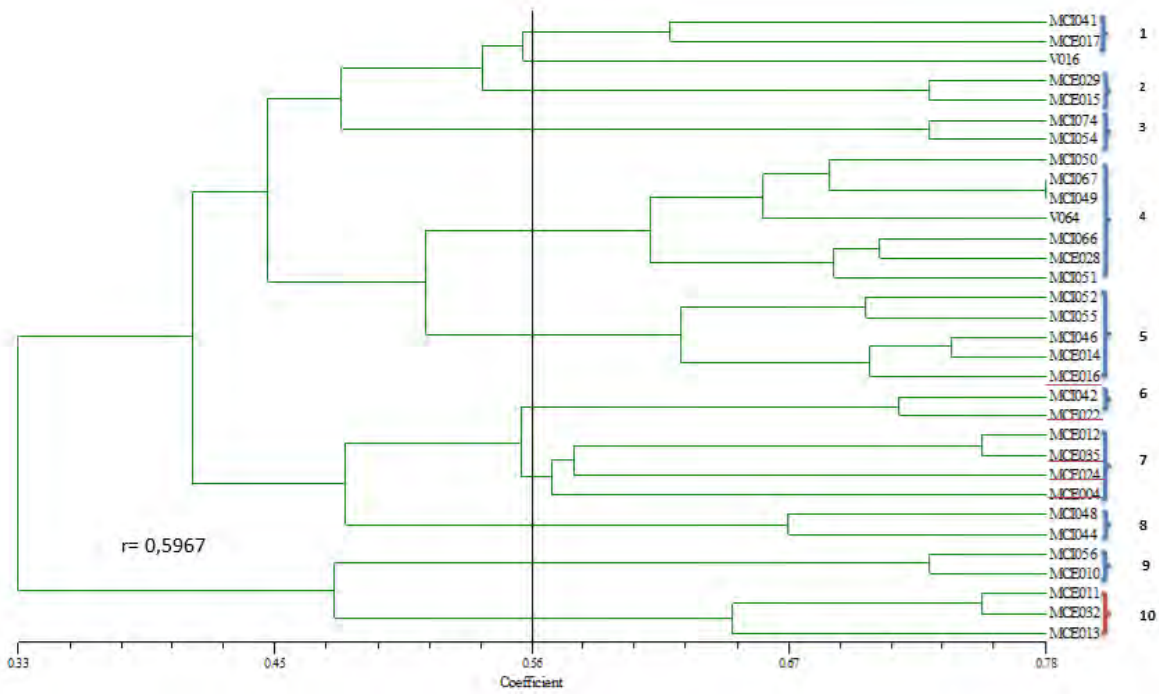


Figura 18. Distribución de los aislados de *Colletotrichum* spp. y de *C. acutatum* procedentes del corregimiento El Encano y del municipio de Ipiales mediante la amplificación con microsátelites RAMs GA y CGA. Fenograma consenso contruido a partir de UPGMA con el con el coeficiente de Sorenson-Dice.

CONCLUSIONES

- La caracterización fenotípica de los aislados de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) procedentes del corregimiento El Encano y del municipio de Ipiales permitió identificar a *Colletotrichum* spp. como agente causal de la antracnosis.
- La amplificación de la región ITS (Internal Transcriber Spacers) del ADN ribosomal permitió identificar a *Colletotrichum acutatum* como agente causal de enfermedad en el municipio de Ipiales y en algunos aislados del corregimiento El Encano.
- Se observó variabilidad fenotípica tanto dentro de las poblaciones como entre ellas.
- Se encontró un 15,26% de variabilidad dentro de las poblaciones y un 84,74% dentro de las poblaciones.

RECOMENDACIONES

- ✓ Es necesario realizar la identificación a nivel de especie de los 8 aislados del corregimiento El Encano, para poder complementar la información brindada en este estudio.

- ✓ En cuanto a los marcadores moleculares RAMs, se debe probar nuevamente las condiciones de PCR y del mix de reacción con los primers CA, CCA y ACA para complementar los resultados y realizar el análisis de variabilidad de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum* spp.

- ✓ Se recomienda aumentar el número de muestras y de sitios de estudio, con el fin de verificar que otras especies de *Colletotrichum* pueden estar infectando los cultivos de mora de castilla en Nariño.

BIBLIOGRAFÍA

- Acero, S. (2007). *Algoritmo para el análisis filogenético: UPGMA*. . Barranquilla: Universidad del Norte.
- Afanador , K., Dror, L., Minz, M., & Freeman, S. (2003). Characterization of Colletotrichum isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a Unique species from the genus. *Phytophatology*, 187.
- Afanador-Kafuri, L., González , A., Gañan, L., Mejía, J., & Álvarez , E. (2014). Characterization the Colletotrichum species causing anthracnose in Andean Blacberry in Colombia. *Plant Diseases*, 98, 1503-1513.
- Alarcón , J., & Chavarriaga, W. (2007). Diagnóstico precoz de la antracnosis de Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz & Sacc, en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. *Agronomía*, 15(1), 11.
- Alarcon , M. (2012). *Caracterización morfológica y molecular de Colletotrichum spp. asociadas a antracnosis de Lupinos mutabilis (chocho) y Solanum betacea (tomate de árbol) en tres provincias del Ecuador*. Sangolqui-Ecuador: Escuela politecnica del ejercito .
- Allendorf, F., Gordon, L., & Sally, N. (2013). *Conservation and the genetic of population*. Wiley-Blackwell.
- Álvarez, E., Ospina, C., Mejía, J., & Llano, G. (2005). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides) en guanábana (Anona muricata) en el Valle del Cauca. *Fitopatología colombiana*, 28(1), 8.
- Álvarez, S. (2013). *Caracterización molecular y patogénica de Colletotrichum spp. en cultivos de tomate de árbol (Cyphomandra betacea (Cav.) Sendt)* . . San Juan de Pasto: Universidad de Nariño.
- Arenas, A., Álvarez, E., Gonzáles, A., & Mejía, J. (2007). Caracterización molecular y patogénica de aislamientos de Colletotrichum spp. asociados a la antracnosis de cultivos de mora del Valle del Cauca. *Memorias XXVIII Congreso ASCOLFI, CIAT*. (pág. 30). Palmira-valle del Cauca: CIAT.
- Bailey, J., & Jeger, M. (1992). Colletotrichum biolog, pathology and control. *CAB international*, 387.
- Bailey, J., O'conell , R., Pring, R., & Nash, C. (1992). Infection strategies of Colletotrichum species. *CAB: international*, 88-120.
- Beltrán, J. (2000). Caracterización y diagnóstico del género Colletotrichum causante de la antracnosis en ñame y otros cultivos. *Producción de semillas por biotecnología.*, 1, 54-45.
- Botero, M. (2002). *Inteacción biológica de microorganismos relacionados con Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz y Sac., agente causal de la antracnosis en tomate de árbol (Cyphomandra betacea (Cav.) Sendt)*. Manizales: Universidad de Caldas.
- Boung, J., Moon, K., Kwang, S., Young, S., Hyun, H., Woung, B., y otros. (2003). Isolation of defense-related genes differentially expressed in the resistance interaction between pepper fruits and the anthracnose fungus Colletotrichum gloeosporioides. *Molecules and Cells*, 15(3), 349-355.

- Bucio, E. (2008). *Caracterización fenotípica de Colletotrichum spp. aislado de aguacate en Michoacán, México*. Michoacán -México.: Universidad de Miochoacan.
- Bucio, E. (2008). *Caracterización fenotípica de Colletotrichum spp. aislados de aguacate en Michoacán, México*. Michoacan-México: Universidad Michoacana de San Nicolás.
- Cadavid, M., Kelemu, S., & Osorio, J. (2007). Diversidad genética de *Colletotrichum* spp. como agente causal de la antracnosis en frutales de Colombia. *Memorias XXXVIII congreso ASCOLFI, CIAT*. (pág. 30). Palmira- Valle del Cauca: CIAT.
- Cai, L., Hyde, K., Tylor, P., Weir, B., Waller, J., Abang, M., y otros. (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 39, 183-204.
- Centro Internacional de Agricultura (CIAT). (2010). *Informe final técnico proyecto: Productores de lulo y mora competitivos mediante la selección participativa de clones élite, manejo integrado del cultivo y fortalecimiento de cadenas de valor*. Palmira-Valle del Cauca: FONTAGRO.
- Contreras , C. (2006). *Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre los aislamientos de Colletotrichum spp. obtenidos de frutos de lulo (Solanum quitoense Lam), tomate de árbol (Solanum betacea Sendt), granadilla (Passiflora ligularis Juss) y tallos de mora (Rubus)*. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.
- Cornell University. (2004). *Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Modulo de aprendizaje, medida de la diversidad genética*. Sokal R. y Rohlf J. *Biometry*:. New York: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research (3rd edn.).
- CORPOICA. (2005). *Tecnología para la producción de frutales de clima frío moderado*. Rionegro, Santander: .
- CORPOICA. (2011). *Mora de castilla. Fortalecimiento de los programas de la calidad e inocuidad en el sector frutas y hortalizas frescas en Colombia*, 40.
- CORPOICA. (2013). *El cultivo de la mora de castilla frutal de clima frío moderado con propiedades curativas para la salud humana*. . Bogotá D.C.: Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria.
- Cruz, L. (2003). *Uso de la diversidad genética de Beauveria bassiana para el diseño de alternativas de control de la broca del café*. . Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.
- Damm, U., Woundenberg, J., Cannon, P., & Crous, P. (2012). *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity*, 39, 45-38.
- DANE. (2014). *Antracnosis, importancia y manejo integrado en el cultivo de tomate de arbol (Cyphomandra betacea)*. *Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria*, 19.
- DANE-ENA. (2013). *Dirección de metodología y producción. Resultados encuesta nacional agropecuaria*, 80.
- De la Rotta, M., Avila , A., & González , R. (2002). *Estudios sobre la antracnosis en mora de castilla*. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J. Vis. Exp.*, 45, 10.

- Domínguez , I., Mohali, S., Marín, M., & Pino, H. (2012). Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) en Venezuela. *Tropical plant pathology*, 26.
- Dorado, G., Rallo, P., Hernández, P., Giménez, M., Benítez, Y., Díaz, A., y otros. (2006). Desarrollo de marcadores moleculares para la trazabilidad, identificación y mejora del olivo, la aceituna y el aceite de oliva. *Cultivo, calidad y medio ambiente* , 540-549.
- Dujardin, J. (2008). Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol*, 8, 875-890.
- Ellegren, H. (2004). Microsatélites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet* , 435-445.
- Femenía, M. (2007). *Caracterización química de cepas de hongos del género Colletotrichum: síntesis de gloeosporiol. Diseño y síntesis de modelos de agentes fungicidas*. Cádiz, España: Universidad de Cádiz.
- Fontdevila, A., & Moya, A. (1999). *Introducción a la genética de poblaciones*. . Madrid: Síntesis.
- Forero , R. (1990). *Estudio morfoagronómico de la raíz de Rubus glaucus Benth (mora de castilla) en tres edades*. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia.
- Franco G y Giraldo C. (2000). El cultivo de la mora. *Corporación colombiana de investigación agropecuaria.*, 130.
- Franco, D., & Hidalgo, R. (2003). *Análisis estadístico de datos de caracterización de recursos fitogenéticos*. Cali, Colombia: IPGRI.
- Franco, G., & Giraldo, C. (2000). El cultivo de la mora. *Corporación colombiana de investigación agropecuaria.*, 130.
- Fulgueira, C. (2013). *Reproducción sexual en hongos*. . Bogotá D.C.: UNR.
- Gañan, L., Álvarez, E., & Castaño, J. (2015). Identificación de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Revista Académica Colombiana*, 39, 152.
- Garrido , C., Carbú, M., & Fernández, F. (2009). Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real time PCR. *Plant pathology.*, 58, 43-51.
- Gatzambide, I. (2005). *Distribución vertical y temporal de Glomerella cingulata (Colletotrichum gloeosporioides) sobre una siembra comercial de Gandul (Cajanus cajan L.)*. Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico.
- GENPAT. (2009). *Evaluación de la resistencia de poblaciones de Solanum betaceum y especies silvestres relacionadas contra poblaciones del patógeno Colletotrichum spp. Convocatoria de investigación, desarrollo tecnológico e innovación*. San Juan de Pasto.: Universidad de Nariño.
- GENPAT-MADR;. (2012). *Caracterización morfológica del patógeno Colletotrichum spp. en tomate de árbol (Solanum betaceum) en el valle de Sibundoy y departamento de Nariño. (Informe final)*. Pasto: Universidad de Nariño.
- González , E. (2003). Microstélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377-388.
- Griffith, G., & Shaw, D. (1998). Polymorphism in *Phytophthora infestans*. Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of AND from pure

- cultures or from host lesions. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 4007-4014.
- Guerber, J., & Correll, J. (2001). Characterization of *Glomerella acutata* the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia*, 93, 216-229.
- Hedrick, P. (2005). *Genetic of populations*. Sudbury-Massachusetts: Jones and Bartlett publishers.
- Hyde, K. (2009). *Colletotrichum*-names in current use. *Fungal Diversity*, 147-182.
- laVH. (20 de agosto de 2008). *Instituto Alexander von Humboldt*. Recuperado el 10 de septiembre de 2014, de www.humboldt.org.co
- Ipiates, A. m. (26 de febrero de 2014). *Plan de ordenamiento territorial*. Recuperado el 18 de Octubre de 2014, de <http://www.ipiales-narino.gov.co/>
- Jaramillo, N. (2014). *Morfometría geométrica: principios teóricos y métodos de empleo*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Jeffries, P., Dodd, J., Jeger, M., & Plumbey, R. (1990). The biology of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*, 39, 343-366.
- Katan, T. (2000). Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 3-22.
- Lewis, M., Nava, C., & Miller, S. (2004). *Identification and management of Colletotrichum acutatum on immature bell peppers*. Department of Plant Pathology. Ohio: Ohio Agricultural Research and development.
- Lisarazo, C. (2005). Dinámica de las fuentes de inóculo e identificación del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum* sp) en guanábana (*Anona muricata* L.). *Revista UDO Agrícola*, 327-382.
- López, J., & Gómez, R. (2008). Tecnología para la producción de frutales de clima frío moderado. *Agronomía del cultivo de la mora (Rubus glaucus Benth)*, 30.
- Manire, C., Rhinehart, H., & Sutton, D. (2002). Disseminated mycotic infection caused by *Colletotrichum acutatum* in a Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*). *Journal of clinical microbiology*, 40, 4273-4280.
- Marcelino, J., Gouli, S., & Parker, B. (2009). Host plant associations of an entomopathogenic variety of the fungus, *Colletotrichum acutatum*, recovered from the elegant hemlock scale, *Fiorinia externa*. *Journal of insect science*, 9, 25.
- Marulanda, M., Isaza, L., & Ramírez, A. (2007). Identificación de las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis en mora de castilla en la región cafetera. *Scientia et technica año XIII.*, 585-590.
- Montero, V., Morales, L., González, G., Anaya, J., Corona, T., & Gálvez, A. (2010). Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Revista mexicana de Ciencias Agrícolas*, 159-174.
- Morales, G., Rodríguez, G., Aspiroz, R., & Pedraza, S. (2009). Temperatura base in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de aguacate en México. *Revista UDO Agrícola*, 414-420.
- Münch, S., Ligner, U., & Floss, D. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of plant physiology*, 165: 45-51.
- Muñoz, J., Morillo, C., & Morillo, A. (2008). Microsatélites amplificados al azar (RAMs) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta agronómica*, 57(4), 219-226.

- NCBI. (2010). *National Center for Biotechnology Information*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Oliveira, R., Moral, J., Bouhmidi, K., & Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del Olivo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 531-548.
- Orozco, M. (2006). *Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de Colletotrichum acutatum Simmonds de cítricos en México*. México D.F: Universidad de Colima.
- Parra, L. (2008). *Relación entre las infecciones quiescentes de Colletotrichum gloeosporioides (Penz) y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango (Mangifera indica L.) variedad hilachada*. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.
- Peres, N., Timmer, L., Adaskaveg, J., & Correl, J. (2005). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *The American phytopathological society, Plant Diseases.*, 89(8), 784-796.
- Perfect, S., Hugues, H., O'Connell, R., & Green, J. (1999). *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27, 186-198.
- Pinzón, Y. (2014). *Caracterización morfológica y molecular de Colletotrichum gloeosporioides aislado de ñame (Dioscorea spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica*. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia.
- PNN de Colombia. (20 de Marzo de 2010). *Parques Nacionales Naturales de Colombia*. Recuperado el 2014 de Octubre de 2014, de <http://www.parquesnacionales.gov.co/>
- Pronatta-CORPOICA. (13 de Agosto de 2014). *Programa Nacional de transferencia de tecnología agropecuaria*. Recuperado el 2014 de octubre de 2014, de AGRONET: <http://www.agronet.gov.co>
- Prusky, D., Freeman, S., & Dickman, M. (2000). *Colletotrichum*: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction. *American Phytopathological Society*, 393.
- Rai, C., Cai, L., & Cannon, P. (2009). *Colletotrichum*-names in current use. *Fungal Diversity*, 39, 147-182.
- Rodríguez, A. (2007). *Caracterización molecular de poblaciones de Colletotrichum spp. asociadas a Coffea arabica en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD*. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.
- Rodríguez, A. (2007). *Caracterización molecular de poblaciones de Colletotrichum spp. asociadas a Coffea arabica en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD*. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.
- Rodríguez, S., González, M., & Mayek, N. (2008). La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27, 53-63.
- Romero C. (2009). Identificación de marcadores microsatélites. Análisis e interpretación de resultados. Prácticas de biodiversidad y marcadores moleculares. *Editorial Universidad Politécnica de Valencia*, 145-156.

- Ruiz , M., & Ureña, M. (2009). Situación actual y perspectivas del mercado de la mora. *Rev. Economic Research Service- ERS*, 16.
- Ruiz, M., & Ureña, M. (2009). Situación actual y perspectivas del mercado de la mora. *Rev. Economic Research Service- ERS.*, 16.
- Saldarriaga, A., Castaña, J., & Arango, R. (2008). Caracterización del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Revista Académica Colombiana*, 32(123), 145-156.
- Santacruz, C. (2013). *Caracterización morfológica, patogénica y molecular de especies de Colletotrichum spp. causantes de antracnosis del fruto de ají y pimenton Capsicum spp. en el Valle del Cauca.* . Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Santacruz, C. (2013). *Caracterización morfológica, patogénica y molecular de especies de Colletotrichum spp. causantes de la antracnosis del fruto de ají y pimentón Capsicum spp. en el Valle del Cauca.* Palmira-Valle del Cauca.: Universidad Nacional de Colombia.
- Sutton, B. (1992). The genus *Glomerella* an its anamorph *Colletotrichum*. *Biology, Epidemiology and Control*, 1-26.
- Talgo, V., Aamot , H., Stromeng, G., Klemsdal, S., & Stensvand, A. (2007). *Glomerella acutata* on highbush blueberry in Norway. *Plant Health Progress*, 130.
- Thalinas , P., Screenivasaprasad, S., Neves, J., & Oliveira, H. (2002). Genetic and morphological of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnoses of lupins. *Phytopathology*, 92, 9.
- Than, P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P., & Hyde, P. (2008). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University Science B9*, 764-778.
- Timmer, L. (2000). Lime anthracnose. *The American Phytopathological Society*, 22-23.
- Toro, M., Manriquez, G., & Suazo, I. (2010). Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfometría descriptiva a la morfometría cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 977-990.
- TROPICOS. (25 de JULIO de 2009). *CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA MORA DE CASTILLA*. Recuperado el 22 de SEPTIEMBRE de 2014, de TROPICOS: [http://www.tropicos.org/mora de castilla](http://www.tropicos.org/mora_de_castilla).
- Velasco, R. (2004). *Principio de las técnicas moleculares basadas en PCR*. Palmira-Valle del cauca: Universidad Nacional de Colombia.
- Weir , B., Johnston, P., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 115-180.
- Wharton , P., & Diéguez- Uribeondo, J. (2004). The Biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del jardín botánico de Madrid*, 61(1), 115-180.
- Zamorano, A., Morillo, A., Morillo H., Vásquez, J., & Muñoz, J. (2007). Caracterización morfológica de mora en los departamentos de Valle del Cauca, Cauca y Nariño de Colombia. *Acta Agronómica*, 51-60.

ANEXOS

ANEXO 1. Registro de muestras y cultivadores corregimiento El Encano.

CÓDIGO	VARIEDAD	MUESTRA	LOCALIDAD	N	W	ALTITUD	PROPIETARIO
MCE002	Silvestre	tallo	El puerto	N 01°09'08,4"	W 077° 07'13,8"	2820m	José A. Diaz
MCE003	silvestre	tallo	El puerto	N 01°09'08,4"	W 077° 07'13,8"	2820m	José A. Diaz
MCE004	silvestre	tallo	El puerto	N 01°09'08,4"	W 077° 07'13,8"	2820m	José A. Diaz
MCE005	fresa	tallo	El puerto	N 01°09'08,4"	W 077° 07'13,8"	2820m	José A. Diaz
MCE006	fresa	tallo	El puerto	N 01°09'08,4"	W 077° 07'13,8"	2820m	José A. Diaz
MCE007	silvestre	tallo	Bellavista	N 01°06'05,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Myriam Rodríguez
MCE009	silvestre	tallo	Bellavista	N 01°08'02,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Myriam Rodríguez
MCE010	silvestre	tallo	Bellavista	N 01°08'02,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Myriam Rodríguez
MCE011	silvestre	tallo	Bellavista	N 01°08'02,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Myriam Rodríguez
MCE012	silvestre	tallo	Bellavista	N 01°08'02,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Juan Acosta
MCE013	silvestre	tallo	Bellavista	N 01°08'02,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Juan Acosta
MCE014	silvestre	tallo	Bellavista	N 01°08'02,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Juan Acosta
MCE015	silvestre	tallo	Bellavista	N 01°08'02,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Juan Acosta
MCE017	silvestre	tallo	santa clara	N 01°08'05,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Jhon Kenedy Botina
MCE019	silvestre	tallo	santa clara	N 01°08'05,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Jhon Kenedy Botina
MCE020	silvestre	tallo	santa clara	N 01°08'05,3"	W 077° 08'04,0"	2831m	Jhon Kenedy Botina
MCE022	fresa	tallo	santa Rosa	N 01°08'05,8"	W 077° 07'53,0"	2807m	Nubia Piandoy
MCE023	fresa	fruto	santa Rosa	N 01°08'05,8"	W 077° 07'53,0"	2807m	Nubia Piandoy
MCE024	silvestre	tallo	santa Rosa	N 01°08'05,8"	W 077° 07'53,0"	2807m	Nubia Piandoy
MCE026	silvestre	tallo	santa Rosa	N 01°08'05,8"	W 077° 07'53,0"	2807m	Hector Cuaican
MCE028	Silvestre	tallo	santa Rosa	N 01°08'05,8"	W 077° 07'53,0"	2807m	Hector Cuaican
MCE032	Silvestre	tallo	Santa Teresita	N 01°07'54,1"	W 077° 07'55,3"	2841m	María Vallejo
MCE035	silvestre	fruto	Santa Teresita	N 01°07'54,1"	W 077° 07'55,3"	2841m	María Vallejo

ANEXO 2. Registro de muestras y cultivadores del Municipio de Ipiales.

CODIGO	VARIEDAD	MUESTRA	LOCALIDAD	N	W	ALTITUD	PROPIETARIO
MCI040	Silvestre	tallo	Yanalá	N 00°52'06,9"	W 077° 34'35,6"	2746m	Isabel Micanquéz
MCI041	silvestre	tallo	Yanalá	N 00°52'06,9"	W 077° 34'35,6"	2746m	Isabel Micanquéz
MCI044	silvestre	tallo	Yanalá	N 00°52'06,9"	W 077° 34'35,6"	2746m	Isabel Micanquéz
MCI048	sin espinas	tallo	Yanalá	N 00°52'22,8"	W 077° 04'17,2"	2700m	William Tuquéz
MCI049	sin espinas	tallo	Yanalá	N 00°52'22,8"	W 077° 04'17,2"	2700m	William Tuquéz
MCI050	sin espinas	tallo	Yanalá	N 00°52'22,8"	W 077° 04'17,2"	2700m	William Tuquéz
MCI051	sin espinas	tallo	Yanalá	N 00°52'22,8"	W 077° 04'17,2"	2700m	William Tuquéz
MCI052	silvestre	tallo	El Rosal	N 00°52'46,9"	W 077° 08'04,0"	2603m	Myriam Rodríguez
MCI053	silvestre	tallo	El Rosal	N 00°52'46,9"	W 077° 08'04,0"	2603m	Myriam Rodríguez
MCI054	silvestre	tallo	El Rosal	N 00°52'46,9"	W 077° 08'04,0"	2603m	Héctor Táquez
MCI055	silvestre	tallo	El Rosal	N 00°52'46,9"	W 077° 08'04,0"	2603m	Héctor Táquez
MCI056	silvestre	tallo	San Juan	N 00°52'59,0"	W 077° 33'19,9"	2633m	Juan Tuquez
MCI057	silvestre	tallo	San Juan	N 00°52'59,0"	W 077° 33'19,9"	2633m	Juan Tuquez
MCI066	silvestre	tallo	San Juan	N 00°52'59,0"	W 077° 33'19,9"	2633m	Juan Tuquez
MCI067	silvestre	tallo	San Juan	N 00°53'14,3"	W 077° 53'00,9"	2566m	Jesús Ituyan
MCI069	silvestre	tallo	San Juan	N 00°53'14,3"	W 077° 53'00,9"	2566m	Jesús Ituyan
MCI074	fresa	tallo	San Juan	N 00°53'14,3"	W 077° 53'00,9"	2498	NN
MCI075	fresa	fruto	San Juan	N 00°53'14,3"	W 077° 53'00,9"	2498	NN

