



**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp.  
OBTENIDOS DE FRUTALES DE CLIMA FRIO MODERADO CON SÍNTOMAS DE  
ANTRACNOSIS.**

**GINNA MARCELA GRANADOS BENAVIDES  
YUDY ALEJANDRA GUEVARA CASTRO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA**

**Bogotá D. C., Colombia  
Junio de 2010**



**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp.  
OBTENIDOS DE FRUTALES DE CLIMA FRIO MODERADO CON SÍNTOMAS DE  
ANTRACNOSIS.**

**GINNA MARCELA GRANADOS BENAVIDES  
YUDY ALEJANDRA GUEVARA CASTRO**

**PROYECTO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de**

**Microbióloga Agrícola y Veterinaria  
Microbióloga Industrial**

**DIRECTOR  
MARÍA CLEMENCIA FORERO DE LA ROTTA  
CODIRECTOR  
JOSÉ SALVADOR MONTAÑA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA  
Bogotá D. C., Colombia  
Junio de 2010**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la resolución No 13 de julio de 1946**

“La universidad no se hace responsable por los conceptos omitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo se velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo en buscar la verdad y la justicia”.



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Anexo No. 4**

**Doctora**

**Janeth Arias**

**Directora Carreras de: Microbiología Industrial y Microbiología Agrícola y Veterinaria**  
**Facultad de Ciencias**


Respetada Doctora:

Con la presente comunicación, hacemos constar que el trabajo de grado titulado: Caracterización Biológica y Molecular de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutales de clima frío moderado con síntomas de Antracnosis. Realizado por las estudiantes Giña Marcela Granados Benavides y Yudy Alejandra Guevara Castro, ha sido revisado y corregido de acuerdo con las observaciones sugeridas por los jurados en la sustentación.

En constancia se firma, a los 17 días del mes de Junio del año 2010.

Cordialmente,

NOMBRE: María Clemencia Forero

FIRMA 

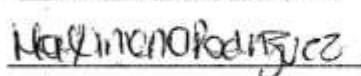
DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE: Jose Salvador Montaña Lara

FIRMA 

CODIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE: María Ximena Rodríguez

FIRMA 

JURADO TRABAJO DE GRADO

FIRMA 

JANETH ARIAS PALACIOS M.Sc M.Ed

DIRECTORA CARRERAS DE MICROBIOLOGIA

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestros Directores María Clemencia Forero de la Rotta y José Salvador Montaña Lara, por la oportunidad, confianza, apoyo constante y disposición para compartir sus conocimientos y experiencias, al realizar este trabajo.

A GeBiX, Diego Jiménez y Daniel Borda, por su paciencia, asesoría, disposición y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A Aura Marina Pedroza, por abrirnos las puertas del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos y a todas las personas que hacen parte de él, por su apoyo y colaboración incondicional.

A María Ximena Rodríguez por su disposición en la resolución de dudas e inquietudes.

A José Peinado, por su colaboración en el análisis estadístico de resultados.

A USBA por el préstamo de equipos y acogida en el laboratorio.

Al CIAT, por su contribución al desarrollo de este Trabajo.

A nuestros padres por su amor, confianza, apoyo incondicional y constante durante el transcurso de nuestras carreras.

A nuestras familias, hermanos y amigos por su compañía y por hacer parte de nuestras vidas.

A todas las personas que creyeron en nosotras y en la realización de este trabajo.

# CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp. OBTENIDOS DE FRUTALES DE CLIMA FRIO MODERADO CON SÍNTOMAS DE ANTRACNOSIS.

Ginna Marcela Granados Benavides, Yudy Alejandra Guevara Castro  
Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias Básicas  
Carreras de Microbiología

## Resumen

Los frutales tropicales se perfilan como una de las mejores opciones en la agricultura Colombiana por el crecimiento de la demanda nacional e internacional. Sin embargo, la antracnosis, enfermedad causada por el fitopatógeno *Colletotrichum* spp. afecta la producción de los cultivos lo que conlleva a pérdidas en el desarrollo socio-económico de los productores. En Colombia, no existe suficiente información relacionada con la caracterización biológica y molecular de este patógeno, razón por la cual se hace necesaria la implementación de estrategias de taxonomía polifásica para su caracterización. En este trabajo se llevó a cabo la caracterización de 18 aislamientos obtenidos de frutos enfermos procedentes de Fusagasugá, y Granada (Cundinamarca) y Puente Nacional (Santander), con base a características morfológicas, de crecimiento, pruebas de patogenicidad cruzada, proteasa y resistencia a benomyl. Los resultados obtenidos con base en la caracterización biológica no permitieron una identificación precisa de los aislamientos de *Colletotrichum* spp., razón por la cual fue utilizada una herramienta molecular complementaria basada en la amplificación de las regiones ITS de los genes ribosomales mediante el uso de iniciadores específicos y el análisis del polimorfismo de la región ITS empleando enzimas de restricción (RFLP). La caracterización fenotípica, permitió identificar los aislamientos obtenidos de frutales de clima frío moderado como miembros del género *Colletotrichum*. Sin embargo el análisis RFLP reveló que posiblemente los 18 aislamientos pertenecen a la especie *C. acutatum*. En este trabajo queda expuesta la utilidad de herramientas moleculares como apoyo a las técnicas convencionales, en la caracterización de *Colletotrichum* spp. La variabilidad obtenida entre aislamientos ratificó la necesidad del uso de técnicas moleculares que complementaron la caracterización y diferenciación entre especies de *Colletotrichum* spp.

**Palabras clave:** *Colletotrichum* spp., Caracterización morfológica, patogenicidad cruzada PCR, PCR-RFLPs.

## Introducción

Los frutales tropicales se perfilan como una de las mejores opciones en la agricultura Colombiana por el crecimiento de la demanda nacional e internacional, dando como resultado la activación de la industria de poscosecha, que actualmente es suplida por importaciones (Álvarez *et al.*, 2005; Espinal *et al.*, 2005). Hoy en día Colombia, ocupa el noveno lugar en exportaciones de frutos exóticos (Proexport, 2008). En el mercado internacional de las frutas tropicales se encuentran productos como: el tomate de árbol, que es cultivado principalmente en los departamentos de Antioquia y Cundinamarca; granadilla, que se cultiva en los departamentos de Antioquia, Valle y Cundinamarca y lulo, producido principalmente en el Huila, seguido por el departamento de Cundinamarca. Estos cultivos poseen una gran importancia económica ya que representan grandes extensiones de tierra cultivada gracias a las condiciones climáticas favorables que se encuentran en el país que permiten no solo aumentar su producción sino ofrecer en el mercado internacional productos de excelente calidad (Contreras, 2006). Sin embargo uno de los principales problemas que enfrenta la comercialización de estas frutas está relacionado con la calidad heterogénea de la mismas como consecuencia de cambios físico-químicos en la epidermis generalmente causados por diferentes fitopatógenos (Espinal *et al.*, 2005). Algunas de especies que causan lesiones en los frutos pertenecen al género *Colletotrichum*, agente causal de la antracnosis. La problemática de esta enfermedad se agrava por la expansión de cultivos en zonas agroecológicas favorables a la enfermedad, constituyéndose en una de las principales limitantes en la producción de frutales de clima frío moderado en Colombia

(Álvarez *et al.*, 2005). La Tabla 1 resume las condiciones agroecológicas necesarias para el cultivo de granadilla, lulo y tomate de árbol descritas por Avilan *et al.*, (1988); Angulo, (2006); Rodríguez *et al.*, (2006) y UNISARC, (2006). *Colletotrichum* spp. ataca las plantas a nivel de tallos, hojas, frutos (enfermedades de poscosecha) y en algunos casos raíz y semilla (Hyde *et al.*, 2009), donde se también puede presentarse en su estado perfecto *Glomerella* spp (Talhinhas *et al.*, 2002 y Agrios, 2005).

**Tabla 1. Características agroecológicas de frutales de clima frío moderado.**

Fruto	Granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> )	Tomate de árbol ( <i>Solanum betacea</i> )	Lulo ( <i>Solanum quitoense</i> )
T° de Crecimiento	12-20°C	14-17°C	11-20°C
Humedad Relativa	70-85%	75-85%	80% ó superior
Altura	1500-1900 msnm	1500-2000 msnm	1800-2500 msnm
pH	5,5 – 7,7	5,5 – 6,5	5,5 – 6,5
Suelo	Textura media, buen drenaje	Franco ó franco arenosos, alto contenido de materia orgánica, buen drenaje	Franco-arenosos o franco-arcillosos, alto contenido de materia orgánica, buen drenaje
Otras Enfermedades	<i>Phomopsis</i> spp., <i>Potyvirus</i> , <i>Alternaria passifloracea</i> , <i>Oidium</i> spp	<i>Oidium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp, <i>Meloidogine</i> spp.	<i>Sclerotinia sclerotium</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Verticillium</i> spp., <i>Pythium</i> spp. <i>Erwinia</i> spp.

El comercio de frutas de clima frío-moderado, se encuentra en gran expansión y son las especies *C. gloesporoides* y *C. acutatum* (Álvarez *et al.*, 2005), las asociadas a enfermedades de posflorecimiento de cultivos de frutas y desarrollo de la antracnosis en varios cultivos causando infecciones latentes y/o quiescentes, razón por la cual posee una gran importancia económica dentro de las enfermedades de poscosecha (Jeffries *et al.*, 1990 y Talhinhas *et al.*, 2005).

Esta enfermedad no solo afecta a los frutales de clima frío-moderado, sino que también afecta otras frutas comerciales como: guanábana (Álvarez *et al.*, 2005), aguacate (Freeman *et al.*, 1996), ñame (Cerón *et al.*, 2006), cítricos y especies no muy comerciales en Colombia como el olivo (Talhinhas *et al.*, 2005), y otros muy comerciales como el café (Rodríguez *et al.*, 2007). También se ha encontrado registros de enfermedad en flores ornamentales como lupinos (Elmer *et al.*, 2001). La antracnosis en Colombia, específicamente en Cundinamarca se presenta durante todo el año y el porcentaje de infección varía dependiendo de las condiciones climáticas siendo la precipitación el factor que más influye en el desarrollo de la enfermedad (Rondón, 1998). La identificación de especies del género *Colletotrichum* se realiza tradicionalmente con base en su caracterización morfológica, que incluye: tamaño de las conidias, producción del peritecio (fase sexual), morfología de las hifas, y características de crecimiento macroscópico, entre otras (Gunnell *et al.*, 1992; Hyde *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009). Las colonias de *Colletotrichum* spp. en medio de cultivo son usualmente blancas, grises o de un color naranja pálido o rosado dependiendo de la especie y en algunos casos se producen pigmentos. Las conidias unicelulares presentan tamaños que pueden variar entre 8-16 x 2.5-4 µm, pueden ser fusiformes, ovoides u oblongadas, de pared delgada, septadas y hialinas. Los apresorios que se presentan en menor proporción tienen un tamaño aproximado de 6.5-11 x 4.5-7.5 µm, pueden ser circulares y con tonalidades que pueden variar de café claro a oscuro (González *et al.*, 1985; Gunnell *et al.*, 1992 y Holliday, 1995). Sin embargo, el uso de técnicas moleculares hoy en día facilita la identificación y diferenciación de las especies en una forma más específica (Hyde *et al.*, 2009).

En cuanto al desarrollo de la enfermedad, se requieren de estructuras especializadas que involucran: tubos germinales, apresorios, hifas intracelulares, e hifas secundarias necrotróficas. Las esporas de *Colletotrichum* spp con la ayuda de señales químicas y físicas, germinan y se diferencia el apresorio (Perfect *et al.*, 1999). En términos generales la conidia germina y forma el apresorio en la superficie de la planta ya sea por aberturas naturales como estomas, lenticelas ó heridas que se presentan sobre la cutícula de la planta, donde la hifa de penetración se desarrolla dentro de las células vegetales, formando haustorios. En condiciones

apropiadas, el hongo puede crecer rápidamente dentro de la planta y causar los síntomas característicos. En circunstancias menos favorables el hongo se encuentra en estado quiescente dentro de los tejidos en el hospedero por un tiempo indeterminado, que finalizará cuando el hongo encuentre las condiciones apropiadas para su desarrollo (Swinburne, 1983; Kuo, 1999; Peres *et al.*, 2005). Este microorganismo también puede tener un periodo de latencia, donde el crecimiento del hongo se restringe a la capa epidérmica. La durabilidad de este periodo depende del sitio de la planta donde se desarrolle y del tiempo en que se demore en aparecer la lesión. En frutales la infección es quiescente y en floración la infección es latente (Bailey *et al.*, 1992; Verma, 2005; Agrios, 2005). Este periodo (quiescencia o latencia) inactivo puede variar en tiempo de acuerdo con las condiciones en las que se desarrolle el patógeno, hasta que estas sean las propicias para su desarrollo. Además de permitir hacer frente al mecanismo de defensa de las plantas hospedantes como: producción de compuestos tóxicos preformados y fitoalexinas (Echeverri *et al.*, 1997 y Verma, 2005).

En la mayoría de casos la infección causada por *Colletotrichum* spp. se inicia cuando el inóculo llega al hospedero por diferentes formas (Bailey *et al.*, 1992; Centro de Investigación Agropecuario, 1998; Kuo, 1999; Wharton *et al.*, 2004 y Arias *et al.*, 2007), entre estas vías se encuentra el agua o la dispersión de conidias que posteriormente se adhieren a la cutícula de la planta; germinan en un tiempo aproximado de 12-24h, produciéndose de esta manera el tubo germinal. Sin embargo, la penetración directa de la cutícula la hace el apresorio que se forma después de que el tubo germinal alcance entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  de longitud. Una vez se encuentran las conidias o las ascosporas (estado telemorfo) en la superficie de la planta, sintetizan proteínas para la formación de apresorios, que pueden formar uno o varios tubos germinativos dependiendo de las condiciones en que se encuentre el hongo. La adhesión de apresorios garantiza que el patógeno se encuentre en constante contacto con el hospedero por el tiempo necesario para garantizar la penetración mecánica ó enzimática (Bailey *et al.*, 1992). Las especies de *Colletotrichum* durante su colonización, emplean dos modos de nutrición: biotrófica donde los nutrientes son obtenidos de las células vivas del hospedero, y necrotrófica donde los nutrientes son obtenidos de células muertas del hospedero que han sido afectadas por el patógeno (Perfect *et al.*, 1999 y Cerón *et al.*, 2006). Adicionalmente, las especies de *Colletotrichum* pueden emplear una o dos estrategias de infección: colonización intracelular hemibiotrófica (fase asintomática) o colonización subcuticular-intramural (Perfect *et al.*, 1999; Mendgen *et al.*, 2002; Wharton *et al.*, 2004; Kleemann *et al.*, 2008 y Münch *et al.*, 2008).

En tomate de árbol, el hongo afecta hojas, ramas y frutos en cualquier estado de desarrollo, se observan lesiones oscuras de color negro, concéntricas, poseen bordes definidos y el centro es deprimido, cuando la enfermedad avanza el fruto se seca y se momifica cayendo al suelo o permaneciendo en la rama. En lulo, el fruto es el principal afectado, se manifiesta con manchas redondas de color café. Esta lesión se caracteriza por estar hundida en el centro, formar anillos concéntricos que deforman el fruto, lo momifican y posteriormente inducen su caída. En granadilla, se observan manchas concéntricas oscuras generalmente de tonalidad morada, café o rojiza, con bordes definidos. También se observa el crecimiento del hongo hacia la pulpa y un ablandamiento hacia el centro de la lesión (Contreras, 2006).

La gran variabilidad en la morfología entre las diferentes especies de *Colletotrichum*, debido en gran parte a la variación de las condiciones ambientales, hacen necesario el uso de herramientas moleculares que permitan una mayor claridad en la clasificación taxonómica (Hyde *et al.*, 2009). El uso conjunto de técnicas moleculares y técnicas de caracterización biológica permite tener una mayor proximidad al momento de determinar la ubicación taxonómica de estos fitopatógenos. Entre las técnicas moleculares más utilizadas se encuentran: la secuenciación de los espaciadores internos de transcripción comúnmente llamados regiones ITS por Internal Transcribed Spacer del ADN ribosomal (ADNr), PCR-RFLPs, PCR-RAPDs, entre otras (Brown *et al.*, 1996; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Abang *et al.*, 2003; Afanador *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2005; Garrido *et al.*, 2008 y Cai *et al.*, 2009). La región ITS que codifica para rRNA se presenta como cluster génico que aparece repetido cientos de veces en el genoma de un hongo, en donde se incluyen: el gen para la subunidad pequeña (18S), el gen para la subunidad (5.8S) y el gen para la subunidad grande (28S). Estos genes están separados por dos secuencias no codificantes, denominadas espaciadores internos transcritos: ITS1 y el ITS2 (Bailey *et al.*, 1992). El hecho de que este cluster génico presenta algunas regiones altamente



conservadas y otras variables, ha permitido el análisis de variación en diferentes niveles taxonómicos y la delimitación de especies (Steven *et al.*, 1992). Sin embargo, la ubicación taxonómica de microorganismos ha sido revaluada a través del tiempo, ya que los métodos tradicionales de clasificación y determinación de especies basados en caracteres morfológicos y biológicos han mostrado la necesidad de ser complementados con caracteres moleculares (Taylor *et al.*, 2000).

En Colombia no existen suficientes reportes relacionados con el patógeno *Colletotrichum* spp, por eso es necesaria su caracterización biológica y molecular, enfocándose en las especies que se reportan con mayor incidencia en frutales de clima frío moderado como: *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. La incidencia de la antracnosis, se incrementa debido a factores como la selección inadecuada de terrenos a cultivar y las malas prácticas culturales por parte de los productores, además del inadecuado uso de fungicidas. Por lo anterior, la capacitación en buenas prácticas agrícolas y la investigación sobre la biología y diversidad sobre el agente causal de la antracnosis, podrían ser herramientas útiles para la búsqueda de mecanismos de control, que disminuyan la incidencia y severidad de la enfermedad, mejorando de esta forma la productividad de los cultivos junto a la condición socio-económica de los productores. El uso de técnicas moleculares sumando a su caracterización biológica permitirá una mayor claridad en cuanto a la ubicación taxonómica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. (Hyde *et al.*, 2009). Por esta razón el presente trabajo pretendió realizar la caracterización biológica y molecular de *Colletotrichum* spp, en frutales de clima frío-moderado, con síntomas de antracnosis.

## **Metodología**

### **Recolección de Muestras**

Los aislamientos de *Colletotrichum* spp se colectaron a partir de frutos de lulo (*Solanum quitoense*), tomate de árbol (*Solanum betaceae*), y granadilla (*Passiflora ligularis*), con síntomas iniciales de antracnosis que se adquirieron en el mercado local y en zonas productoras de los frutos como: Fusagasuga y Granada (Cundinamarca) y Puente Nacional (Santander). Se realizaron cinco muestreos tomando tres frutales de interés, con el fin de obtener patógenos con orígenes diferentes.

### **Aislamientos**

En condiciones de asepsia la superficie de los frutos fue lavada con agua y jabón secándolos con una toalla de papel (Berstein *et al.*, 1995). De las lesiones, se tomaron fragmentos de 5mm de diámetro que se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante cinco minutos (Dhingra *et al.*, 1995) y luego en agua destilada estéril para su lavado. Posteriormente cada fragmento se secó y sembró por triplicado en cajas de petri con PDA y se incubó a 20°C durante 8 días. Cada aislamiento se resembró en placas de PDA para su purificación (Contreras, 2006). Para la obtención de cultivos monospóricos se siguió la metodología propuesta por Álvarez *et al.*, (2005) con algunas modificaciones en este trabajo; posteriormente se almacenaron en papel filtro de acuerdo a Aricapa (1994) para su conservación a largo plazo.

### **Caracterización Morfológica**

Después de 8 días de incubación del cultivo monospórico se realizó la caracterización morfológica que comprendió la evaluación del color de las colonias y el tipo de micelio (aéreo denso ó superficial) de acuerdo con Álvarez *et al.*, (2005), Contreras, (2006) y Freeman *et al.*, (1998). Adicionalmente se determinó el crecimiento de cada aislamiento midiendo el diámetro de la colonia en intervalos de 24 horas durante 7 días, de acuerdo con el procedimiento propuesto por Smith *et al.*, (1990). Los datos de crecimiento fueron linealizados empleando la aplicación Solver (Microsoft Excel 2007), con el fin de determinar la velocidad de crecimiento (Bernstein, *et al.*, 1995). Para la caracterización de las conidias, se realizaron observaciones al microscopio (40X) con el fin de establecer la morfología de las mismas y asignarlas a una de las tres categorías establecidas para este género: 1) Fusiformes, lados ahusados en ambos extremos, 2) cilíndricas con lados rectos y extremos redondos en ambos lados y 3) cilíndricas con lados rectos, un extremo puntudo y otro redondo (Smith *et al.*, 1990; Contreras, 2006). El tamaño de las conidias se determinó empleando una regla en µm midiendo el largo y ancho, promediando el valor obtenido para 100 conidias seleccionadas al

azar de cada uno de los aislamientos. Adicionalmente y como un parámetro que puede ser de utilidad, se calculó el área promedio de las conidias para cada aislamiento.

### **Sensibilidad al Benomyl**

La sensibilidad al Benomyl es una técnica empleada para la diferenciación entre especies de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* (Freeman *et al.*, 1998). En este caso, se siguió el protocolo descrito por Peres *et al.*, (2002) con modificaciones en este trabajo. El Benomyl se adicionó al PDA en concentraciones de 0,5 g/L, 1 g/L, y 1,5 g/L. La prueba se realizó por triplicado colocando en cada caja un disco de agar con micelio crecido durante 7 días. La incubación se realizó a temperatura ambiente por 10 días, tiempo en el cual se tomó la medida del diámetro de la colonia. Con el fin de determinar el porcentaje de inhibición, a los valores del diámetro de la colonia se restó el tamaño inicial del disco de agar (diámetro: 0,5 mm). Posteriormente se calcularon los valores correspondientes a la DL50 por medio de la linearización del porcentaje de inhibición (Microsoft Excel 2007).

### **Prueba de la proteasa**

Esta prueba también ha sido usada para la diferenciación entre las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. El medio que contiene leche descremada, permitió evaluar la producción de proteasas de *C. acutatum*, al establecer una reacción positiva y otra negativa para *C. gloeosporioides*. Las cajas se sembraron tomando un fragmento de agar (0,5 cm de diámetro) con crecimiento micelial que fué incubado a temperatura ambiente durante 3 días (Martin *et al.*, 1999; Abang *et al.*, 2003); para cada aislamiento se realizaron tres repeticiones. La prueba positiva, se visualiza como un halo transparente alrededor de la zona de crecimiento del hongo (Contreras, 2006).

### **Pruebas de Patogenicidad Cruzada**

Esta prueba se realizó con el fin de observar la capacidad patogénica que tienen los aislamientos en generar síntomas de antracnosis sobre frutos diferentes al hospedero inicial. Se emplearon 3 frutos (lulo, tomate de árbol y granadilla) por aislamiento y dos como controles. La superficie de cada uno de ellos se desinfectó de acuerdo a Bernstein *et al.*, (1995) y los sitios donde se realizó la inoculación fueron marcados con lápiz de cera. La suspensión de conidias de *Colletotrichum* spp. se ajustó a una concentración inicial de  $10^6$  conidias/ml y fue aplicada en frutos sanos donde se realizó previamente una herida con ayuda de una aguja de disección estéril (tratamiento 1) y en frutos sanos sin ningún tipo de herida (tratamiento 2). Los controles negativos correspondieron a frutos sobre los cuales se colocó agua destilada estéril en reemplazo del inóculo y el control positivo correspondió a la cepa inóculada sobre el hospedero del cual fue aislada. Inmediatamente después de la inoculación, todos los tratamientos fueron colocados en cámara húmeda (90-100%), realizando observaciones diarias del desarrollo de la enfermedad; las cámaras húmedas se mantuvieron a una temperatura ambiente, por un período de 30 días (Contreras, 2006) bajo un diseño completamente al azar.

## **Caracterización Molecular de aislamientos de *Colletotrichum***

### **Multiplicación de los aislamientos y obtención de ADN**

Los aislamientos del estudio se sembraron en caldo Papa-Dextrosa y se incubaron durante 15 días a 25°C. En condiciones de asepsia, después de la incubación se colectó el micelio y se filtró al vacío. El micelio extraído se depositó en cajas de Petri y se secó a 35°C durante tres días; posteriormente el micelio seco se almacenó en tubos eppendorf de 1,5ml a -20°C (Álvarez *et al.*, 2005) y la extracción del ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito por Ceniz (1992).

### **Amplificación de la región ITS**

Para la amplificación de los espaciadores internos ITS1-ITS2 se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los primers universales: ITS1:(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'), ITS4:(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). La mezcla de reacción contenía Buffer *Taq* 1X (100mM de Tris HCl, pH 8, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 500 mM KCl) 0,2 μM de cada uno de los dNTPs, 0,5 μM de cada primer, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1μL de ADN, agua HPLC filtrada (0,22 μm) autoclavada y 0,04 U/μL de *Taq* polimerasa, para un volumen final de 15μL. Las condiciones de amplificación consistieron en: un ciclo inicial de denaturación a

94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 55°C, 2 minutos a 72°C y una extensión final de 4 minutos a 72°C (Afanador *et al.*, 2003), utilizando el termociclador PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, MA.

Para diferenciar las especies de *Colletotrichum* spp., *C. gloesporioides* y *C. acutatum* se emplearon los primers específicos: *CgInt* (*C. gloesporioides*): (5'GGCCTCCCGCTCCGGGCGG3') y *CaInt2* (*C. acutatum*): (5'GGGGAAGCCTCTCGCGG3'), combinados con el cebador ITS 4 de la región conservada del gen ribosomal 28S (Afanador *et al.*, 2003). Se realizó una PCR-anidada, siguiendo el protocolo propuesto por Martínez *et al.*, (2009), de la siguiente manera: Buffer *Taq* 1X (100mM de Tris HCl, pH 8, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 500 mM KCl) 0,2 µM de cada uno de los dNTPs, 0,3 µM de cada primer, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µL de ADN, agua HPLC filtrada (0,22 µm) autoclavada y 0,04 U/µL de *Taq* polimerasa, para un volumen final de 15µl. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MJ PTC-100 con el siguiente perfil de temperaturas para el primer *CgInt*: un ciclo inicial de denaturación a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 65°C, 1 minuto a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Para el primer *CaInt2*: un ciclo inicial de denaturación a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los controles empleados (ADN total de *C. gloesporioides* y *C. acutatum*) para los análisis moleculares, fueron proporcionados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

#### **Análisis PCR-RFLP**

Para el análisis con enzimas de restricción se evaluaron las enzimas: *Taq* I, *Hind* III, (Álvarez *et al.*, 2005) *Rsa* I, *Alu* I, (Álvarez *et al.*, 2005; Buddie *et al.*, 1999) *Sau*3AI (Buddie *et al.*, 1999). La digestión con las diferentes enzimas se realizó por separado a 37°C durante 2h, utilizando 5U de cada enzima, en un volumen final de 15µl. de acuerdo con Álvarez *et al.*, (2005).

Los productos amplificados con los primers específicos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% en buffer TAE 1x teñido con Syber safe 2 µl/100ml. El corrido se llevó a cabo en una cámara de electroforesis Thermo EC330 Midicell® Primo, a 70V por 1h. El peso molecular del producto amplificado se evaluó por comparación visual con el marcador de tamaño molecular 1kb (Promega®). Los productos de digestión con las enzimas de restricción fueron separados en gel de agarosa 2%. Las condiciones de corrido tinción y visualización se realizaron de igual forma que con los productos de PCR. En todos los casos los gels fueron fotografiados en un equipo Gel documentation de Biorad®.

## **Resultados y Discusión**

### **Caracterización Morfológica**

La caracterización morfológica de *Colletotrichum* spp., incluyó aspectos como el color de las colonias, forma y tamaño de las conidias, que permiten una primera aproximación para su ubicación taxonómica. Con relación a la coloración de las colonias (Anexo 1), varios autores han sugerido que esta característica puede ser utilizada para diferenciar las especies *C. acutatum* y *C. gloesporioides* (Freeman *et al.*, 1998; Abang *et al.*, 2003 y Peres *et al.*, 2005). De acuerdo con estos autores *C. acutatum* presenta colonias de color salmón mientras que *C. gloesporioides* de color gris. En el presente trabajo, el 17% de los aislamientos presentaron color salmón, el 55% color gris y el 28% de color blanco (Figura 1). Los resultados obtenidos sugieren una variabilidad entre los aislamientos obtenidos. Las cepas aisladas en las que se evidenciaron colonias de color salmón presentaron en su mayoría, una pigmentación rosada al reverso de la caja de petri lo que concuerda con Peres *et al.*, (2005) quien reporta que este tipo de pigmentación podría ser característica de *C. acutatum* f. sp. *chromogenum*.

En cuanto a la coloración de las conidias Freeman *et al.*, (1998) afirma que *C. acutatum* genera masas conidiales de color salmón mientras que *C. gloesporioides* genera masas conidiales de coloración grisácea. En este trabajo, el 55% de los aislamientos presentaron conidias de color grisáceo y el 39% de color salmón (Anexo 1). No obstante, el 6% restante no presentó esporulación lo que dificultó su asignación a una especie particular. (Figura 2).

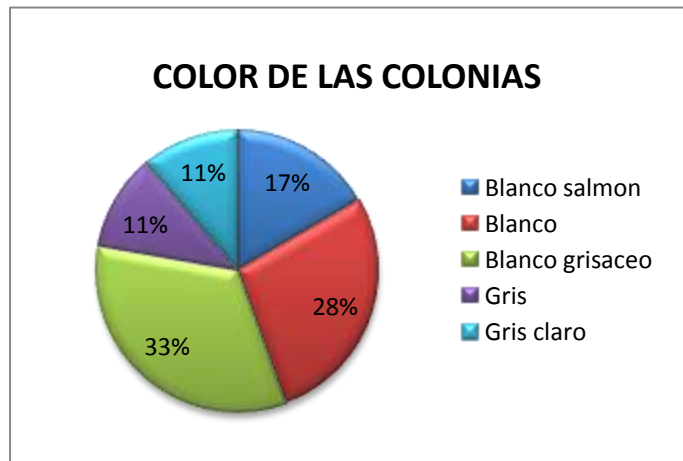


Figura 1. Coloración en las colonias de cepas aisladas de frutales de Clima frío moderado.

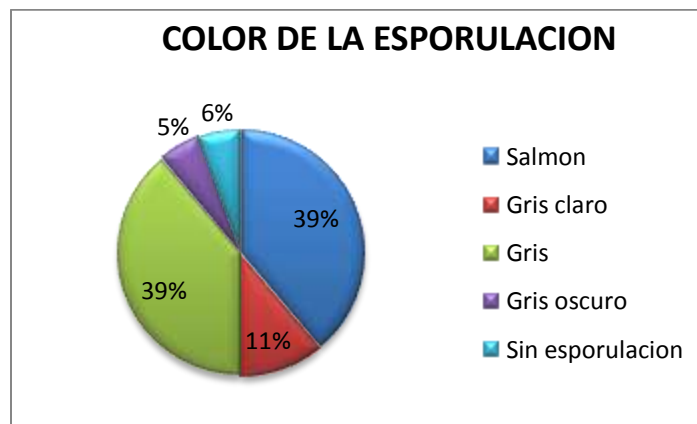
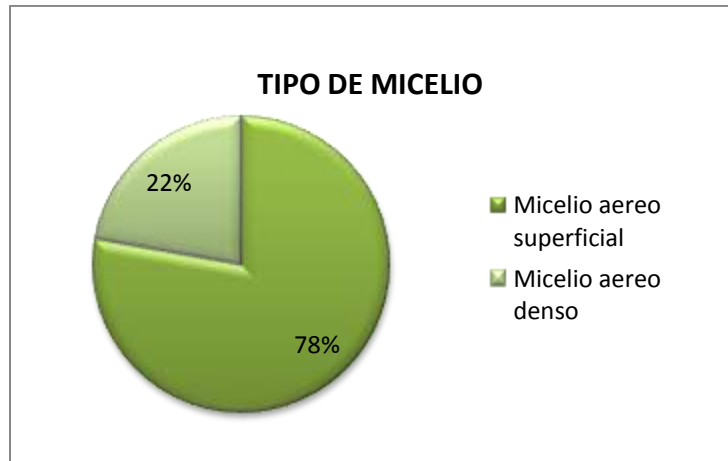


Figura 2. Coloración en la esporulación de cepas aisladas de frutales de Clima frío moderado.

El crecimiento en forma radial se encontró presente en todos los aislamientos, en donde el tipo de micelio es característico según la especie de *Colletotrichum* (Katan et al., 1996). Según Freeman *et al.*, (1998), el micelio aéreo puede ser descrito de dos formas: micelio aéreo superficial y micelio aéreo denso (Anexo 1). El tipo de micelio con mayor prevalencia en los aislamientos obtenidos fue el micelio aéreo superficial, con un porcentaje de 78%. De otra parte el micelio aéreo denso se presentó en el 22% de los aislamientos (Figura 3). Se han descrito varios tipos de micelio en *C. gloesporioides* por Katan *et al.*, (1996), a). El tipo conidial que no presenta micelio aéreo, b). El tipo micelial plano con poco micelio aéreo, c). El tipo micelial con micelio aéreo denso y d). El tipo conidial micelial con micelio aéreo denso y masas de conidias. Al ser descritos diferentes tipos de micelios se observó que la variabilidad que puede presentarse en esta especie es alta (Freeman *et al.*, 1998), por lo tanto el tipo de micelio no es un criterio que establece la identificación directa de las especies de *Colletotrichum*.



**Figura 3. Tipo de micelio en cepas aisladas de frutales de Clima frío moderado.**

La observación microscópica de las conidias permitió evidenciar morfologías variadas como: fusiformes, ovoides u oblongadas, de pared delgada, septadas y hialinas. Todos estos morfotipos han sido descritos como típicos del género *Colletotrichum* (González *et al.*, 1985; Gunnell y Gubler 1992 y Holliday, 1995). Sin embargo, observando las diferentes morfologías conidiales encontradas en algunos aislamientos en este trabajo (Figura 4) (Anexo 1) y contrario a lo propuesto por Freeman *et al.*, (1998) y Peres *et al.*, (2005) quienes afirman que *C. acutatum* presenta conidias alargadas y fusiformes y *C. gloeosporioides* oblongas u ovaladas, la morfología de la conidia no puede ser utilizada como criterio único para la diferenciación de especies.



**Figura 4. Características de las conidias de la cepa LA2, 1. A). Conidias globosas con terminaciones redondas. B). Conidias largas y fusiformes.**

Según los sistemas de clasificación tradicionales, el tamaño de las conidias para *C. gloeosporioides* varía entre 12-17 x 3.5- 6  $\mu\text{m}$  y las de *C. acutatum* 8.5-16.5 x 2.5-4  $\mu\text{m}$ , Sutton (1992) y Afanador *et al.*, (2003) y aunque en este estudio algunos tamaños se encuentran dentro de los rangos propuestos para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* tal vez no es el criterio más adecuado para diferenciar las dos. Al comparar el largo, ancho y área de las conidias de aislamientos de cada uno de los frutales, se evidenció una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) (anexo 1), confirmando la alta variabilidad en cuanto al tamaño de conidias del género *Colletotrichum*. Al comparar el tamaño de las conidias producidas en cada uno de los frutales no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) (anexo 1), lo que sugiere que el tamaño de las conidias no es un criterio determinante en la delimitación de especies.

Comparando los resultados de la caracterización macroscópica y microscópica, se puede sugerir que la asignación de una especie para los aislamientos de *Colletotrichum* spp. en este caso no es clara. Diferentes autores sugieren que los caracteres morfológicos del hongo no son suficientes para la clasificación y definición de taxos (Cay *et al.*, 2009 y Hyde *et al.*, 2009). En este trabajo, la apariencia de la colonia en medio

de cultivo, tipo de micelio, el tamaño y forma de las conidias y la tasa de crecimiento de las cepas, mostraron una gran variabilidad entre los aislamientos de los diferentes frutales. Este resultado es consistente con lo propuesto por autores como Bernstein *et al.*, (1995); Freeman *et al.*, (1998); Peres *et al.*, (2005); Garrido *et al.*, (2009) y Hyde *et al.*, (2009), quienes afirman que *Colletotrichum* spp. tienen una amplia gama de hospederos y bajo condiciones no controladas se puede comportar y desarrollar diferente. Sin embargo, otras características morfológicas como la formación del apresorio, temperatura óptima de crecimiento, presencia o ausencia de setas, presencia del estado teleomorfo y el estilo de vida del hongo: saprófito, endófito o patógeno, que en este trabajo no fueron consideradas podrían brindar información complementaria que permitiría, en un esquema polifásico, hacer una aproximación precisa para la ubicación taxonómica de los aislamientos (Freeman *et al.*, 1998; Abang *et al.*, 2003; Cay *et al.*, 2009 y Hyde *et al.*, 2009). La variabilidad obtenida entre aislamientos ratifica la necesidad del uso de técnicas moleculares que complementen la caracterización y diferenciación entre *C. gloesporioides* y *C. acutatum* (Freeman *et al.*, 1998; Abang *et al.*, 2003; Cay *et al.*, 2009 y Hyde *et al.*, 2009).

El crecimiento libre fue medido a los 7 días (Anexo 1), y adicionalmente se determinó la velocidad de crecimiento y el tiempo de incubación. En los aislamientos caracterizados inicialmente como *Colletotrichum* spp. con base en observaciones macro y microscópicas, se encontró que la media de las velocidades de crecimiento fue de 4,79 mm/día. Sin embargo entre aislamientos provenientes de diferentes cultivos no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) indicando, en este caso específico, que el crecimiento libre tampoco es un criterio determinante en la diferenciación de especies de *Colletotrichum*. Adaskaveg *et al.*, (1997) plantea que la velocidad de crecimiento de *Colletotrichum* spp. se encuentra en promedio en 8 mm/día. Por otro lado los tiempos de incubación presentaron diferencias estadísticamente significativas, al encontrarse una mayor variabilidad ( $p \leq 0,05$ ) entre frutales que al interior de cada uno.



**Figura 5** Crecimiento radial de aislamientos de *Colletotrichum* spp. en PDA. De izquierda a derecha: Fila 1: GRA1, TA3,1, TA3,2, TA2; Fila 2: LA2,1, LA1, GRA3 y GRA2 .

### **Sensibilidad al Benomyl**

El Benomyl es un fungicida del grupo de los benzimidazoles que inhibe el ensamblaje microtubular afectando directamente el desarrollo del microorganismo sin afectar el estado fisiológico y la germinación de las conidias (Peres *et al.*, 2004). Las colonias de *C. acutatum* son más tolerantes a diferentes fungicidas, entre ellos al benomyl (Peres *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002; Peres *et al.*, 2004 y Martínez *et al.*, 2009). De acuerdo con los reportes de Peres *et al.*, (2004), las cepas tanto de *C. gloesporioides* como de *C. acutatum* son sensibles, sin embargo, a través de los años han ido desarrollando resistencia, dando como resultado cepas moderadamente resistentes de *C. acutatum* y cepas muy sensibles ó muy resistentes de *C. gloesporioides*.



**Figura 6. Prueba benomyl, cepa GRA5. Resistencia a las diferentes concentraciones de benomyl.**

El uso indiscriminado del Benomyl en el país consecuencia de las inadecuadas prácticas agrícolas contribuye no solo a la contaminación en el suelo sino a la creación de resistencia en las cepas. Es importante que los fungicidas sean aplicados correctamente para alcanzar un control efectivo de la antracnosis (Arias *et al.*, 2007) ya que si no se hace de esta forma, el grado de resistencia al Benomyl se puede originar debido a una mutación en un codón en el gen de la  $\beta$ -tubulina del citoesqueleto (Chung *et al.*, 2006; Nakaune *et al.*, 2007). Lo anterior puede explicarse debido a que la enfermedad se viene combatiendo con la aplicación de fungicidas de los cuales los agricultores no conocen sus características, dosis de aplicación adecuada y proceso epidemiológico del hongo, lo que resulta en la adquisición de este tipo de mecanismos (Arias *et al.*, 2007). Chung *et al.*, (2006) reportan que la sensibilidad al benomyl no puede ser considerada como una característica distintiva entre las especies de *Colletotrichum* ya que *C. gloeosporioides* puede llegar a tener una sensibilidad similar a la de *C. acutatum*.

Al relacionar los resultados a nivel biológico y molecular, el uso de técnicas como los RFLPs permitieron la posibilidad de caracterizar la mayoría de los aislamientos como *C. acutatum*, que no es ni altamente sensible ni tolerante al benomyl, ya que niveles entre el 0,1 y el 1  $\mu\text{g/ml}$  del fungicida lo inhiben entre el 20 y el 50%, aunque usualmente estas concentraciones si inhiben totalmente otras especies de *Colletotrichum* (Peres *et al.*, 2005). El diámetro de las colonias de *C. acutatum* fue medido para calcular el porcentaje de inhibición y obtener la DL50. El valor de la DL50 de las cepas no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). Cabe resaltar que la DL50 para la cepa GRA5 fue de 1,02 g/L. Este valor es superior al obtenido para las demás cepas que presentaron valores entre 0,082 g/L – 0,307 g/L (Anexo 2) y coincide con el valor DL50 propuesto por Bailey, *et al.*, (1992) para especies resistentes de *Colletotrichum* (1,2g/L).

Según Peres *et al.*, (2002), si se aplica un tratamiento con Benomyl 3 días después de la infección por *C. acutatum in vitro*, se elimina un elevado porcentaje de la población logrando prevenir síntomas, desarrollo y presuntivamente la esporulación. Debe tenerse en cuenta que además del Benomyl otros factores como: la competencia con microorganismos benéficos y posibles patógenos, mecanismos de defensa de la planta y las condiciones ambientales pueden afectar el desarrollo de *Colletotrichum* spp. (Peres *et al.*, 2004).

#### **Prueba de la proteasa**

Con esta prueba se obtuvo 3 cepas presuntivas de *C. gloeosporioides* y 15 cepas presuntivas de *C. acutatum* (Anexo 3). El criterio de evaluación consiste en la formación o no de un halo transparente alrededor de la colonia. Una prueba positiva está determinada por la hidrólisis de la caseína del medio con la correspondiente formación del halo. En el caso contrario la prueba es considerada negativa (Figura 7). Se encuentra documentado que las colonias de *C. acutatum* son positivas para esta prueba, mientras que las de *C. gloeosporioides* son negativas. *Colletotrichum* spp. produce un amplio rango de enzimas que les permiten ocasionar la infección en los diferentes tejidos vegetales y en estados avanzados producir necrosis, las enzimas que se encuentran en mayor cantidad son las enzimas que degradan la pared celular como las

poligalacturonidasas, pectin-lasas y las proteasas que son de gran importancia en el proceso de infección en el tejido (Bailey *et al*, 1992).



**Figura 7. Prueba de la proteasa. A la izquierda cepa TA3,1, como prueba negativa. A la derecha cepa LM1, como prueba positiva.**

En este caso solamente los aislamientos TA2, TA3,1 y GRA5 fueron negativas para esta prueba, sugiriendo que se trata de la especie *C. gloesporioides* y los demás aislamientos corresponderían a *C. acutatum*. Sin embargo, como se muestra más adelante, los resultados obtenidos mediante la caracterización molecular basada en el análisis RFLPs contradicen este resultado, pues en ese caso todos los aislamientos son relacionados con *C. acutatum*. Es evidente entonces que esta prueba no contribuye a la diferenciación entre especies de *C. acutatum* y *C. gloesporioides*, confirmando la necesidad de utilizar técnicas moleculares.

#### **Patogenicidad Cruzada**

Todos los aislamientos presentaron patogenicidad cruzada, debido a que las inoculaciones realizadas en los diferentes frutales, permitieron el desarrollo de la enfermedad con la sintomatología característica (Anexo 4). Se observaron lesiones definidas, de color negro, concéntricas y blandas tal como lo describe Zarate, (1998). Se logró evidenciar que las cepas de mayor incidencia en los diferentes frutales fueron las aisladas de tomate de árbol. Por su parte las cepas de granadilla y lulo, tardaron más en producir los síntomas de la enfermedad en los diferentes frutales. También se logró evidenciar que en los frutales inoculados con la suspensión conidial en sitios previamente lesionados, los signos visibles de la enfermedad aparecen más rápido en comparación con aquellos donde no se causaron heridas previamente. En el caso particular de los frutos de granadilla los síntomas de la enfermedad se manifestaron tardíamente (después de 22 días).

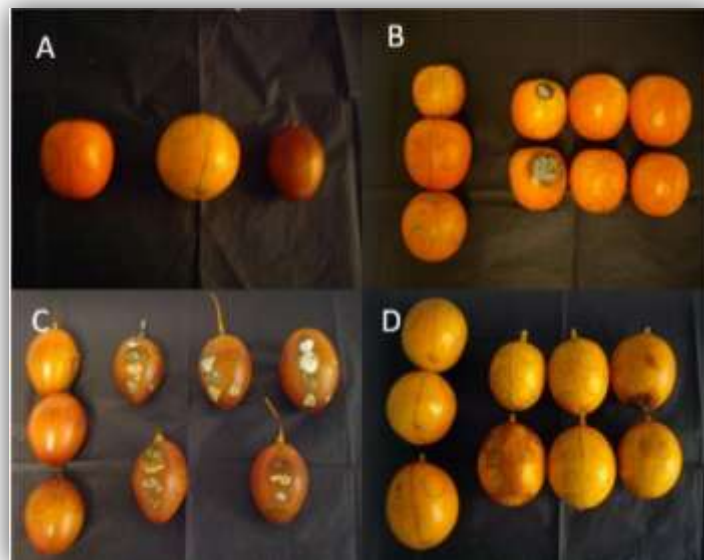
Todos los aislamientos de lulo LM2, LA2, LA2, 1, LM8, LM1, 1 y LM1 (Figura 8), fueron patogénicos para su hospedero al ser inoculados sobre los lugares con heridas y presentaron patogenicidad cruzada en tomate de árbol y granadilla. La sintomatología se evidenció al sexto día de la inoculación, en la zona con heridas previamente realizadas, a diferencia de la expresión de sintomatología en la región inoculada sin heridas donde los síntomas de la enfermedad aparecieron después de 22 días. La cepa LA1 no evidenció síntomas en lulo, tanto en la región con heridas como en la región sin heridas.

Todas las cepas aisladas de tomate de árbol presentaron patogenicidad en todos los frutales, TG3, TA3,2, TA1, TG1, TM3, TA3,1, TA2 y TG1 (Figura 9). La expresión inicial de la sintomatología en tomate y lulo se evidenció al sexto día después de la inoculación con la suspensión de conidias en la región con heridas y en el día 11 en la zona sin heridas solo en tomate. En granadilla las cepas aisladas de tomate de árbol, mostraron la sintomatología de la enfermedad después del día 22 independientemente si el tejido fue lesionado o nó.





**Figura 8. Pruebas de Patogenicidad Cruzada, aislamientos de lulo. A. Controles. B. Cepas inoculadas en tomate de árbol. C. Cepas de inoculadas en lulo. D. Cepas inoculadas en granadilla.**



**Figura 9. Pruebas de Patogenicidad Cruzada, aislamientos de tomate. A. Controles. B. Cepas inoculadas en lulo. C. Cepas inoculadas en tomate de árbol. D. Cepas inoculadas en granadilla.**

Con las cepas aisladas de granadilla GRA3, GRA1, GRA2 y GRA5, inoculadas en tomate de árbol, se presentaron síntomas después de seis días independientemente de que se hubiera realizado ó no una herida previa, mientras que en lulo los síntomas fueron visibles a los veintidós días en los sitios previamente lesionados y en los sitios sin heridas no se presentó síntoma alguno. En granadilla la antracnosis se observó entre el día 11 y el 22 en ambas regiones inoculadas (Figura 10).



**Figura 10. Pruebas de Patogenicidad Cruzada, aislamientos de granadilla. A. Controles. B. Cepas inoculadas en cada frutal.**

Freeman *et al.*, (1998) sugieren que tanto *C. gloesporioides* como *C. acutatum* poseen un alto potencial de patogenicidad cruzada, debido a que cepas de *C. gloesporioides* aisladas en su estudio de manzana y mango, además de cepas de *C. acutatum* aisladas de melocotón, manzana y anémona, fueron inoculadas infectando otros huéspedes como lo fueron la manzana, el aguacate, la almendra y el mango, demostrando la alta patogenicidad cruzada para ambas especies al desarrollarse la enfermedad. Según los resultados obtenidos a nivel molecular las cepas aisladas correspondieron a *C. acutatum*. Según Peres *et al.*, (2005) la especie *C. acutatum* se encuentra compuesta por varios subgrupos genéticos de baja y poca especificidad por un hospedero. Lo anterior puede evidenciarse en los resultados obtenidos en ensayos de patogenicidad cruzada, en donde todas las cepas fueron patogénicas para todos los frutales de clima frío moderado del presente estudio.

Peres *et al.*, (2005) también sugieren que la alta incidencia de *C. acutatum* encontrada en aislamientos, puede deberse a que esta especie tiene la capacidad de infectar los tejidos jóvenes de la planta con menor inmunidad como las inflorescencias o estructuras florales donde el hongo se encuentra en estado quiescente. La formación de frutos conlleva a la salida del estado quiescente y aparición de la enfermedad en poscosecha. Este hecho puede explicarse por la producción de conidias secundarias en la superficie de los tejidos y a la expresión de genes que codifican la biosíntesis del ácido jasmónico y el etileno, así como a los genes que regulan la producción del ácido 3 indol acético, que actúan como altos inductores en la infección de *C. acutatum* (Peres *et al.*, 2005).

#### **Identificación de las especies: Caracterización genética**

Empleando los primers universales ITS1 e ITS4, se obtuvo un amplicón de 580pb que coincide con lo reportado por Bailey *et al.*, (1992), ratificando la amplificación de la región conservada en el genoma de un hongo, como se observa en la Figura 11.

Bailey y colaboradores (1992), sugieren que el uso de los primers específicos combinados con el primer ITS4 pueden ser utilizados para diferenciar las especies de *C. acutatum* y *C. gloesporioides*. Trabajos adelantados por Afanador *et al.*, (2003), Álvarez *et al.*, (2005) y Garrido *et al.*, (2009), muestran que los primers específicos Calnt2 y CgInt amplifican fragmentos de 490 y 450 pb en *C. acutatum* y *C. gloesporioides* respectivamente. Utilizando estos primers, en este trabajo, se lograron diferenciar las cepas TA3,1, TA1, LM1 y LM2 e identificarlas como *C. acutatum* incluyendo el control para esta especie (490pb). Los demás aislamientos presentaron producto de amplificación tanto con los primers Calnt2 y CgInt, donde el control para *C. gloesporioides* no amplificó en ninguno de los casos posiblemente por la falta de especificidad del primer CgInt.

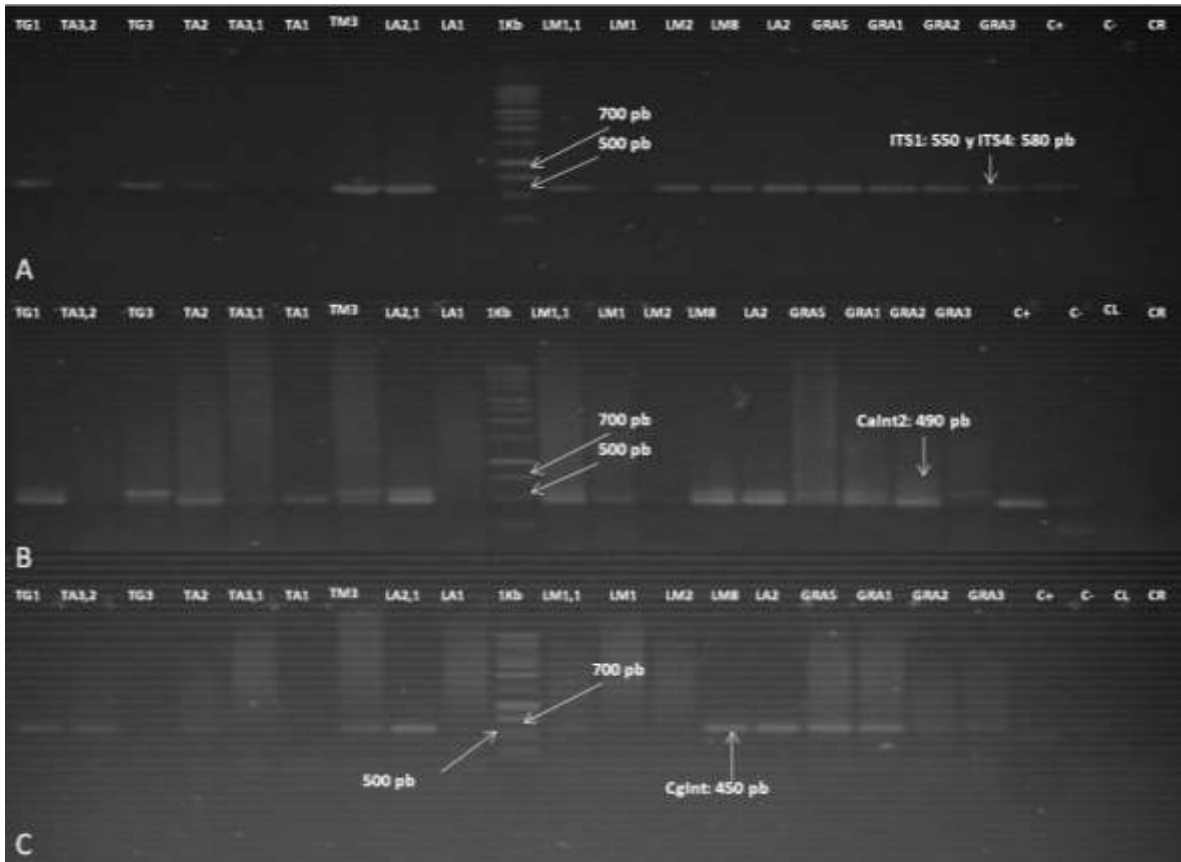


Figura 11. A). Amplificación de la región ITS, C+ *Fusarium* spp., C- *Azotobacter* spp., CR Agua mq. B). Primer CalInt2, C+ *C. acutatum*, C- *C. gloeosporioides*, CL. *C. lindemuthianum*. CR Agua mq. C). Primer CgInt, C+ *C. gloeosporioides*, C- *C. acutatum*, CL *C. lindemuthianum*, CR Agua mq.

Considerando que los primers específicos no suministraron un panorama claro acerca de la ubicación taxonómica de los aislamientos y que algunos de los resultados presentaron poca consistencia con los obtenidos mediante la caracterización biológica. Se realizó el análisis de restricción (Figura 12 y 13) con el fin de detectar polimorfismos entre los aislamientos. Buddie *et al.*, (1999); Afanador *et al.*, (2003); Álvarez *et al.*, (2005) y Garrido *et al.*, (2009) utilizando diferentes enzimas de restricción lograron la identificación y diferenciación de especies del género *Colletotrichum*.

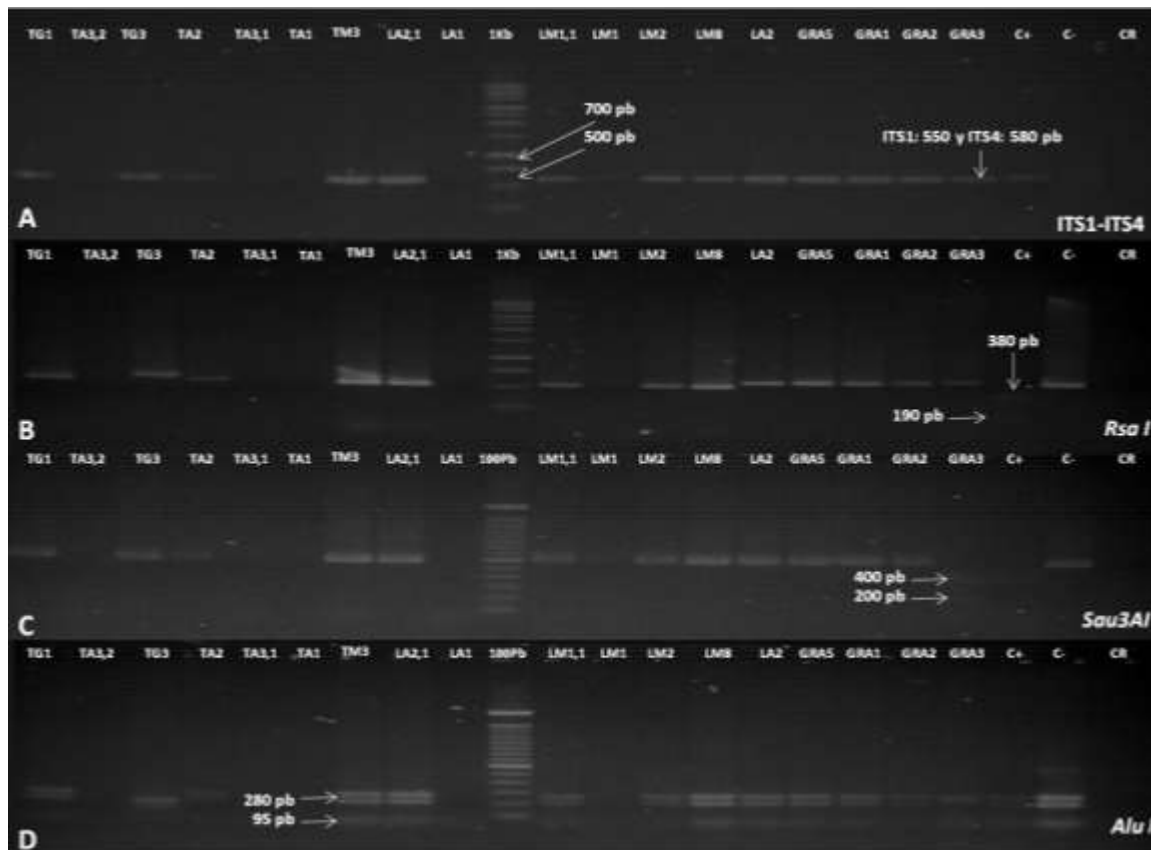
#### Análisis con enzimas de Restricción RFLPs

En el análisis con RFLPs las enzimas *Rsa I*, *Sau3AI* y *Taq I*, mostraron polimorfismos entre las dos especies. La enzima *Rsa I* por su parte no presentó corte en ninguno de los aislamientos con excepción del control *C. gloeosporioides*. Lo anterior sugiere que todas las cepas podrían clasificarse como *C. acutatum*. Álvarez *et al.*, (2005) y Buddie *et al.*, (1999), reportan para *RsaI* fragmentos de 190/380 pb y 190/400, para *C. gloeosporioides* respectivamente y ausencia de cortes para *C. acutatum* (Tabla 2) de tal forma que el tamaño de 590 pb podría corresponder a la región ITS amplificada con los primers universales. Por otro lado, la enzima *Taq I* presentó polimorfismos con fragmentos de 250, 300 y 350 pb, en la mayoría de las cepas a excepción del control de *C. gloeosporioides*, sugiriendo que las demás cepas pueden pertenecer a la especie *C. acutatum*. Con la enzima *Sau3AI* también se observaron polimorfismos particularmente para la cepa GRA3 y el control de *C. gloeosporioides* con fragmentos de 200 y 400 pb. La demás cepas y el control de *C. acutatum*, no evidenciaron fragmentos de restricción conservando intacto el tamaño del amplicón (580 pb). Según Buddie *et al.*, (1999), la enzima *Sau3AI*, presenta un patrón monomórfico entre las especies de *Colletotrichum*, generando fragmentos de 260, 220, 60/50 pb (Tabla 2).

**Tabla 2. Tamaño de los fragmentos de restricción reportados para las especies de *C. acutatum* y *C. gloesporioides*. Con las enzimas *Rsa* I, *Hind* III, *Sau*3AI, *Taq* I, *Alu* I.**

Enzima	Tamaño del fragmento de restricción (pb)	
	<i>C. acutatum</i>	<i>C. gloesporioides</i>
<i>Rsa</i> I	No cortes (Alvares <i>et al.</i> , 2005; Buddie <i>et al.</i> , 1999)	190, 380 (Alvares <i>et al.</i> , 2005; Buddie <i>et al.</i> , 1999)
<i>Hind</i> III	No cortes (Alvares <i>et al.</i> , 2005)	No cortes (Alvares <i>et al.</i> , 2005)
<i>Sau</i> 3AI	260, 220, 60/50 (Buddie <i>et al.</i> , 1999)	260, 220, 60/50 (Buddie <i>et al.</i> , 1999)
<i>Taq</i> I	No reportes	No reportes
<i>Alu</i> I	280, 95 (Alvares <i>et al.</i> , 2005) 590 (Buddie <i>et al.</i> , 1999)	280, 95 (Alvares <i>et al.</i> , 2005) 380, 210 (Buddie <i>et al.</i> , 1999)

Los resultados obtenidos en este trabajo con la enzima *Sau*3AI no soportaron la hipótesis de patrón monomórfico propuesta por Buddie *et al.*, (1999) para las especies de *Colletotrichum* pues como se observa en la figura 12C, en la mayoría de aislamientos no se presenta sitio de corte para esta enzima, pero en el caso del control *C. gloesporioides* y el aislamiento GRA3 la enzima corta generando fragmentos de 200 y 400pb aproximadamente. Aunque los resultados obtenidos con *Sau*3AI hacen suponer que la cepa GRA3 corresponde a *C. gloesporioides*, los resultados obtenidos con las enzimas *Rsa* I y *Taq* I indican que se trata de *C. acutatum* (Buddie *et al.*,1999 y Álvarez *et al.*, 2005).



**Figura 12. A) Amplificación región de la región ITS con los primers universales ITS1-ITS4. B) Digestión con *Rsa* I, patrón polimórfico. C) Digestión con *Sau*3AI, patrón polimórfico. D) Digestión con *Alu* I, patrón monomórfico. C+. *C. gloesporioides*, C-. *C. acutatum*, CR. Agua mq.**

Es necesario aclarar que la información disponible con relación a patrones de restricción de regiones ITS con la enzima *Sau3AI* es muy escasa razón por la cual se consideró que la información derivada del RFLP con las enzimas *Rsa I* y *Taq I* es más útil en el momento de clasificar la cepa.

Con la enzima *Alu I* se obtuvo un patrón monomórfico para todos los aislamientos y los dos controles con fragmentos de 95 y 280pb, excepto para TG3 donde aparentemente el patrón de bandas es el mismo pero hay una ligera diferencia en el tamaño de los fragmentos. Este resultado confirma lo encontrado por Álvarez *et al.*, (2003) para estas enzimas (Tabla 2), pero no coincide con los resultados obtenidos por Buddie *et al.*, (1999) quien sugiere polimorfismos para las dos especies, con un fragmento de 590 pb para *C. acutatum* y fragmentos de 380 y 210 pb para *C. gloesporioides*. Por su lado la enzima *Hind III* no presentó cortes en ninguno de los aislamientos y controles, hecho que coincide con lo propuesto por Álvarez *et al.*, (2005) (Figura 13) (Tabla 2). Con los resultados obtenidos del análisis RFLP, se puede sugerir que la mayoría de cepas aisladas de frutales tropicales de clima frío moderado con síntomas de antracnosis, podrían corresponder a *C. acutatum*.

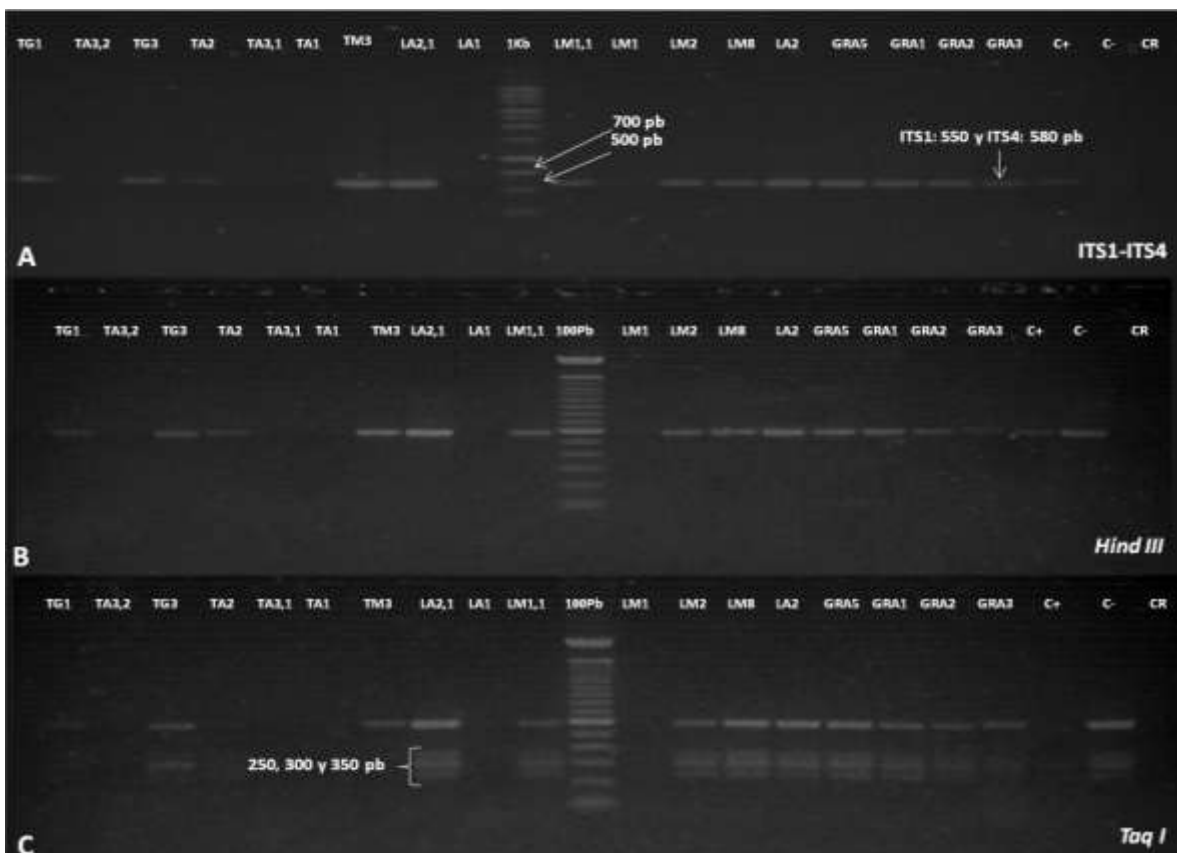


Figura 13. A) Amplificación región ITS. B) Digestión con *Hind III*, patrón monomórfico. C) Digestión con *Taq I*, patrón polimórfico. C+. *C. gloesporioides*, C-. *C. acutatum*, CR. Agua mq.

### Discusión final

La caracterización biológica de especies de *Colletotrichum* spp. comprendió la descripción de la coloración de la colonia y el tipo de micelio, que aunque reflejaron variabilidad entre los aislamientos demostraron ser características de *Colletotrichum* spp. En cuanto al tamaño y forma de las conidias, las formas oblongas, fusiformes, delgadas y ovoides, fueron determinadas para el género aunque no permitieron la delimitación de las especies. La sensibilidad al benomyl, la prueba de la proteasa como aspectos diferenciales entre *C. acutatum* y *C. gloesporioides* y los ensayos de patogenicidad cruzada, sugirieron la adquisición de

mecanismos de resistencia, defensa y patogenicidad en diferentes hospederos con sintomatología característica y desarrollo de la antracnosis. Aspectos evolutivos que aunque no fueron específicos, ratificaron que los aislamientos obtenidos a partir de frutales de clima frío moderado correspondieron al género *Colletotrichum*. Lo anterior también demostró que los caracteres morfológicos y biológicos permitieron un acercamiento a la identificación del microorganismo. Sin embargo, para la diferenciación entre especies fue determinante el uso de técnicas moleculares como los RFLPs que permitieron clasificar los aislamientos de lulo, granadilla y tomate de árbol como posibles *C. acutatum*. Lo anterior sugiere que los métodos tradicionales de clasificación y determinación de especies basados en caracteres morfológicos y biológicos necesitan ser complementados con caracteres moleculares (Taylor *et al*, 2000). Se encuentra documentado que solo las condiciones agroecológicas y de un hospedero determinado son una presión de selección importante que determina la variabilidad fenotípica del microorganismo. Taylor *et al.*, (2000) afirman que los estudios filogenéticos empleando herramientas moleculares han permitido incluir más especies dentro de un género que las que se podrían incluir con base en caracteres biológicos o morfológicos. En este estudio, solo al complementar la caracterización biológica, morfológica y molecular se logró identificar a los aislamientos obtenidos como pertenecientes a una sola posible especie, permitiendo así una aproximación a la ubicación taxonómica bajo un esquema polifásico. Aunque en este trabajo no se realizó un análisis filogenético, los estudios futuros que realicen la secuenciación de las regiones ITS obtenidas en este trabajo o de otros genes claves como el de la  $\beta$  tubulina y la hibridación ADN-ADN podrían obtener resultados más certeros sobre la delimitación de las especies.

### **Conclusiones**

La caracterización biológica de especies de *Colletotrichum* spp. comprendió la coloración de la colonia y el tipo de micelio, que aunque reflejaron variabilidad entre los aislamientos demostraron ser características de *Colletotrichum* spp. En cuanto al tamaño y forma de las conidias, las formas oblongas, fusiformes, delgadas y ovoides, fueron determinadas para el género aunque no permitieron la delimitación de las especies. El tamaño de las conidias sugirió una alta variabilidad de los aislamientos obtenidos de lulo, granadilla y tomate de árbol, aunque al interior de cada frutal no se evidenciaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). La sensibilidad al benomyl, la prueba de la proteasa como aspectos diferenciales entre *C. acutatum* y *C. gloesporioides* y los ensayos de patogenicidad cruzada, sugirieron la adquisición de mecanismos de resistencia, defensa y patogenicidad en diferentes hospederos con sintomatología característica y desarrollo de la antracnosis. La amplificación de la región ITS combinada con primers específicos, permitió la identificación de las cepas TA3,1, TA1, LM1 y LM2, como posibles *C. acutatum*, los demás aislamientos que amplificaron para ambos primers específicos (CgInt, Calnt2) sugirieron la falta de especificidad del primer para *C. gloesporioides*. El uso de técnicas moleculares como los RFLPs, permitieron clasificar todos los aislamientos como *C. acutatum*. Según los resultados obtenidos, los caracteres morfológicos y biológicos del hongo no son criterios suficientes para la clasificación y definición de las taxas, por lo que se requirió un enfoque polifásico. La variabilidad obtenida entre aislamientos ratificó la necesidad del uso de técnicas moleculares como la amplificación de la región ITS con primers específicos y el análisis con RFLPs, que complementaron la caracterización biológica.

### **Recomendaciones**

En próximas investigaciones se recomienda tener en cuenta otros aspectos morfológicos como, la formación y características del apresorio, temperatura óptima de crecimiento, presencia o ausencia de setas y formación del estado teleomorfo, que podrían brindar mayor información para la delimitación de especies. Además, se sugiere educar a los agricultores con Buenas Prácticas Agrícolas, con el fin de controlar la enfermedad y disminuir el inóculo presente en la planta o en el ambiente, ya que el uso indiscriminado de fungicidas ha llevado a la adquisición de mecanismos de resistencia del microorganismo y por ende a la alta variabilidad encontrada en este trabajo. Finalmente se recomienda, que en próximos estudios se realice la secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 para la obtención de mayor información sobre las especies de *Colletotrichum* en los frutales de clima frío moderado de interés en este estudio, así como el uso de otras técnicas moleculares con los RAPDs, RAMs, secuenciación del gen  $\beta$ -tubulina y la hibridación ADN-ADN, con el fin de realizar estudios filogenéticos.

## Bibliografía

- Abang M., Winter S., Mignouna H., Green K. and Asiedu R. 2003. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp. 486-496.
- Afanador L., Minz D., Maymon M. and Freeman S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* Isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and Identification of a Unique Species from the Genus The American Phytopathological Society. Vol. 93, No. 5, p. 579-587.
- Agrios, G 2005. *Plant Pathology*. Third edition, Academic Press. San Diego, California. p. 275, 379-389.
- Álvarez E., Ospina C., Mejía J. y Llano G. 2005, Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. *Centro Internacional de Agricultura CIAT*, Cali, Colombia. Vol. 28, No. 1, p. 1-8.
- Angulo C. y Rafael C. 2006. Lulo: El cultivo. Primera edición. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia. p.100
- Arias B. y Carrizales L. 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio Cedeño, Estado de Monagas, Venezuela. *Bioagro* 19: 19-25.
- Aricapa, M.G. y Correa, F. 1994. Almacenamiento de hongos en papel filtro. *Ascolfi Informa* 20: 29-30.
- Avilán, R. y Leal P. 1988. *Manual de Fruticultura: cultivo y Producción*. De América, C.A. Chacaito, Caracas, Venezuela, 9. P. 1023-1033.
- Bailey J.A. y Jeger M.J.(1992).*Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. British Society for plant Pathology.
- Bernal J. y Lobo M. 1988. El cultivo del tomate de árbol. En: Instituto Colombiano Agropecuario. Curso Nacional sobre frutales de clima frío. ICA, Medellín.
- Bernstein B., Zehr E., Dean R., and Shabi E. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts, *Plant Dis.* 70:478-482.
- Brown A. E., Sreenivasaprasad, S. and Timmer L. W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86: 523-527
- Buddie A., Martínez P., Bridge P., García M., Querol A., Cannon P., and Monte E. 1999. Molecular characterization of *colletotrichum* strains derived From strawberry. *Mycol. Res.* 103: 385±394.
- Cai L., Hyde K.D., Taylor P., Weir, B., Waller, J.M., Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C. and Johnston, P.R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, p. 183-204.
- Cenis, J.L (1992). Rapid Extraction on fungal DNA for PCR amplification, *Nucl. Acids. Res.*, 20: 2380.
- Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (Venezuela), 1998. El cultivo del manguero en Venezuela. Biblioteca Venezuela. p. 167.
- Cerón L., Higuera B., Sánchez J., Bustamante S. and Buitrago G. 2006. Growth and Development of *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* During Culture in Liquid Medium. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 11 No. 1, p. 99-109.
- Chung, W., Ishii, H., Nashimura, K., Fukaya, M., Yano y K., Kajitani, Y. 2006. Fungicide Sensitivity and Phylogenetic Relationship of Anthracnose Fungi Isolated from Various Fruit crops in Japan. *Plan Disease*, Vol. 90 No.4, p. 506-512.
- Contreras C. A. 2006. Caracterización y pruebas de Patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* ssp. Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), Mango (*Mangifera indica* L) y Tallos de mora (*Rubus Glacus* Benth) con síntomas de antracnosis. *Microbiólogo Agrícola y veterinario*. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Colombia.
- Dhyngra O. and Sinclair B. 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press. P. 434
- Echeverri F., Torresm F., Quiñones W., Cardona G., Archbold R., Roldan J., Brito I., Luis J. and Lahlou E. 1997. Danielone, a phytoalexin from papaya fruit. *Phytochemistry*, Vol. 44, No. 2, p. 255-256.
- Espinal C., Martínez H. y Peña Y. 2005. La cadena de los frutales de exportación en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de Trabajo No. 67. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agroclimas Colombia.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose and root necrosis of Strawberry in Israel. *Plant Disease*, vol. 82 No. 6, p. 516-521.
- Garrido C., Carbú M., Fernandez F., Budge G., Vallejo I., Colyer A. and Cantoral J. 2008. Isolation and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. Causing anthracnose of strawberry in south west Spain. *Eur J Plant Pathol* 120:409–415

- Garrido C., Carbú M., Fernández F., Acero I., Vallejo I. and Cantoral J. 2009. Phylogenetic relationships and genome organization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. *Eur J Plant Pathol* 125: 397- 411.
- Gunnell P. S. and Gubler W. D. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia* 84: 157-165.
- Holliday, P. 1995 Fungus diseases of tropical crops. Dover Publication, Inc. New York. P. 624.
- Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J. Z., Prihasturi, H., 2009. *Colletotrichum*: A catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, p. 1-17.
- Hyde, K.D, Cai, L, Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U. , Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L. and Zhang, J.Z. 2009. *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity*, p. 147-182.
- Katan, T., and Shabi, E. 1996. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from almond in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 597-600.
- Kuo, K. 1999. Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Proc. Natl. Sci. Counc.* Vol. 23, No. 3, p. 126-132.
- Martinez, E. P., Hío, J.C., Osorio, J.A. and Torres, M.F., 2009. Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. *Agronomía Colombiana* 27, p. 211-218.
- Martín M. and García F., 1999. *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 105, No. 8, p. 733-741
- Münch S., Lingner U., Floss D., Ludwig N., Sauer N. and Deising H. 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, Vol. 165, p. 41-51.
- Nakaune, R. and Nakano, M. 2007. Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of  $\beta$ -tubulin 1 gene regulated by putative leucin zipper protein CaBEN1. *Fungal Genetics and Biology* 44, p. 1324-1335.
- Peres, N.A.R., Souza, N.L., Zitko, S.E. and Timmer, L.W. 2002. Activity of Benomyl for Control of Postbloom Fruit Drop of Citrus Caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*. Vol. 86 No. 6, p. 620-624.
- Peres, N.A.R., Souza, N.L., Peever, T.L. and Timmer, L.W. 2004. Benomyl Sensitivity of Isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from Citrus. *Plant Disease*. Vol. 88 No. 2, p. 125-130.
- Peres, N.A.R., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E. and Correll, J.C., 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*. Vol. 89 No. 8. p. 784-796.
- Perfect S., Hughes H., Connell R. and Green J. 1999. *Colletotrichum*: A model Genus for Studies on Pathology and Fungal-Plant Interactions (Review). *Fungal Genetics and Biology* 27, p. 186-198.
- Proexport, 2008. Informe frutas exóticas, mermeladas y frutas deshidratadas. Subdirección de Inteligencia de Mercados – DIC.
- Rodríguez T. y Zulueta O. 2006. Producción Limpia de Tomate de Árbol. UNISARC, SENA Regional Risaralda. p. 68
- Rodríguez A y Gaitán A. 2007. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum spp.* Asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico de CBD. Centro de investigaciones de Café, CENICAFÉ. p. 1-13.
- Rondón J. 1998. Estudio Biológico y Epidemiológico de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penz), del tomate de árbol (*Solanum betacea*, (Cav) Sendt), y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia. *Corpoica*, p. 1-13.
- Santos, B. and Romero, F. 2002. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. *Crop Protection* Vol.21 p. 11-15.
- Screenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A.E. and Mills, P.R., 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45, p. 650-655.
- Smith B. and Black L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plan Dis.* Vol.74: 69-76.
- Steven, B.L. and Taylor, J. W. (1992). Phylogeny of five Fungus-like Protoctistan *Phytophthora* species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers or Ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* 9: 636-653.
- Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In *Colletotrichum: Biology, Pathology & Control* Bailey J. A., Jeger M. J. CABi. UK. p 1-27.
- Talhinhos, P., Neves, J. and Oliveira, H. 2002. Genetic and Morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose of Lupins. *Genetics and Resistance*. Vol. 92, No. 9, p. 986-996.
- Talhinhos P., Sreenivasaprasad S, Neves J. and Oliveira H, 2005. Molecular and Phenotypic Analyses Reveal Association of Diverse *Colletotrichum acutatum* Groups and a Low Level of *C. gloeosporioides* with Olive Anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2987-2998.



- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., and Fisher, M. C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31, 21–32.
- UNISARC, SENA 2006. Guía de campo: Granadilla, para manejo de plagas y enfermedades en granadilla. Santa Rosa de Cabal. p. 2-9, 13-15.
- Verma, N. 2005. Epidemiology of *Colletotrichum acutatum*, cause of anthracnose on Highbush Blueberry, In British Columbia. University of British Columbia, Master of Science, Canada. p. 11-18.
- Zarate, R. D. 1981. Estudios etiológicos de las principales enfermedades del guanábano en el Valle del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias en Palmira.
- Zarate, R. D 1998. Enfermedades de la guanábana (*Anona muricata* L.) Tercera Edición. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Departamento de Agricultura. P. 1-31
- Wharton P. and Uribeondo J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. Vol. 61, p. 3-22.

## ANEXOS

### Anexo 1. Caracterización morfológica de aislamientos.

Tabla 1. Caracterización Macroscópica

COLOR DE LAS COLONIAS	COLOR DE ESPORULACION	TIPO DE MICELIO	ASPECTO DEL MICELIO
Blanco salmón	Salmon	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco salmón	Salmon	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco	Salmon	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco	Gris claro	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco	Salmon	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco	Blanco	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco grisáceo	Gris	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco	Gris clara	Micelio aéreo denso	Algodonoso
Gris claro	Gris	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco grisáceo	Salmon	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco grisáceo	Gris	Micelio aéreo denso	Algodonoso
Blanco grisáceo	Gris	Micelio aéreo denso	Algodonoso
Banco grisáceo	Salmon	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco grisáceo	Gris	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Gris	Gris oscura	Micelio aéreo denso	Algodonoso
Gris	Gris	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Gris claro	Gris	Micelio aéreo superficial	Algodonoso
Blanco salmón	Salmon	Micelio aéreo superficial	Algodonoso

Tabla 2. Forma de las Conidias

CEPA	CONIDIAS OBLONGAS U OVALADAS	CONIDIAS ALARGADAS Y FUSIFORMES
TA1	POSITIVO	
TA2	POSITIVO	
TA3,1	POSITIVO	
TA3,2		POSITIVO
TG1		POSITIVO
TG3	POSITIVO	
TM3	POSITIVO	
LA1	POSITIVO	
LA2		POSITIVO
LA2,1		POSITIVO
LM1	POSITIVO	
LM1,1		POSITIVO
LM2	POSITIVO	
LM8	POSITIVO	
GRA1	POSITIVO	
GRA2	POSITIVO	
GRA3	POSITIVO	
GRA5		POSITIVO

Tabla 3. Tamaño de las Conidias

VARIABILIDAD DEL TAMAÑO DE LOS CONIDIOS ( $\mu\text{m}$ )									
Cepa	Media largo	Desv.est	CV	Media ancho	Desv.est	CV	Media área	Desv.est	CV
TG1	8,590	1,596	18,580	2,040	0,281	13,795	17,560	4,011	22,841
TG3	8,740	0,917	10,491	1,955	0,175	8,974	17,100	2,438	14,258
TA2	8,410	1,918	22,806	2,230	0,617	27,676	18,725	7,033	37,557
TM3	8,710	0,902	10,359	2,180	0,373	17,102	18,975	3,750	19,763
LA2,1	6,340	0,966	15,241	1,985	0,366	18,415	12,595	3,011	23,904
LM2	7,900	0,905	11,450	1,700	0,389	22,897	13,500	3,821	28,305
LA2	10,150	1,250	12,318	2,270	0,510	22,450	23,050	5,919	25,680
GRA1	12,000	1,400	11,665	2,630	0,646	24,561	31,610	8,728	27,612
GRA2	12,320	1,775	14,404	2,395	0,519	21,662	29,485	7,622	25,849
GRA3	12,250	1,266	10,337	2,180	0,386	17,712	26,670	5,295	19,855
GRA5	10,920	1,212	11,096	3,000	0,000	0,000	32,760	3,635	11,096
TA3,1	9,410	1,026	10,902	2,590	0,534	20,603	24,500	6,523	26,626
TA1	8,500	0,937	11,029	2,820	0,435	15,437	24,130	5,318	22,037
TA3,2	9,470	1,167	12,327	2,085	0,450	21,572	19,735	4,745	24,045
LM1	9,400	1,155	12,284	1,985	0,417	21,015	18,825	4,899	26,025
LA1	8,200	1,497	18,262	1,925	0,260	13,502	15,825	3,768	23,811
LM8	8,060	0,941	11,673	1,885	0,309	16,371	15,230	3,148	20,671
LM1,1	8,740	0,860	9,841	2,020	0,301	14,893	17,690	3,388	19,152

Tabla 4. Ancho de Conidias

Análisis de varianza de un factor:

Ancho de Conidias

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Tomate de Árbol	7	15,9	2,271428571	0,10015595
Lulo	7	13,77	1,967142857	0,02917381
Granadilla	4	10,205	2,55125	0,12327292

ANÁLISIS DE

VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,90457629	2	0,452288145	5,92104908	0,012722164	3,682320344
Dentro de los grupos	1,145797321	15	0,076386488			
Total	2,050373611	17				

Tabla 6. Análisis de varianza de un factor: Área de conidias

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Tomate de Árbol	7	140,725	20,10357143	9,05698095
Lulo	7	116,715	16,67357143	12,638481
Granadilla	4	120,525	30,13125	7,16497292

Tabla 5. Análisis de varianza de un factor: Largo deconidias

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Tomate de Árbol	7	61,83	8,832857143	0,18522381
Lulo	7	58,79	8,398571429	1,47121429
Granadilla	4	15,36073127	3,840182816	22,3235353

ANÁLISIS DE

VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	71,61118349	2	35,80559174	6,98334705	0,007185259	3,682320344
Dentro de los grupos	76,90923454	15	5,127282303			
Total	148,520418	17				

ANÁLISIS DE

VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	470,1698168	2	235,0849084	23,2499989	2,53584E-05	3,682320344
Dentro de los grupos	151,6676902	15	10,11117935			
Total	621,8375069	17				

Tabla 7. Crecimiento Libre Velocidad

CEPA	VEL. CRECIMIENTO	T. INCUBACIÓN
TA1	5,2571	1,5199
TA2	3,5143	0,8482
TA3,1	3,8857	1,3260
TA3,2	5,1714	1,6317
TG1	5,0286	0,9205
TG3	6,4000	1,1146
TM3	3,8000	1,6491
LA1	5,0286	1,0530
LA2	4,7428	0,2128
LA2,1	4,8857	0,8499
LM1	3,4000	0,9216
LM1,1	3,6286	0,8714
LM2	5,0571	0,9077

<b>LM8</b>	4,4857	0,7473
<b>GRA1</b>	3,1714	0,5586
<b>GRA2</b>	4,7714	1,2515
<b>GRA3</b>	6,2571	1,1172
<b>GRA5</b>	5,1143	1,2086

Tabla 8. Velocidad de Crecimiento

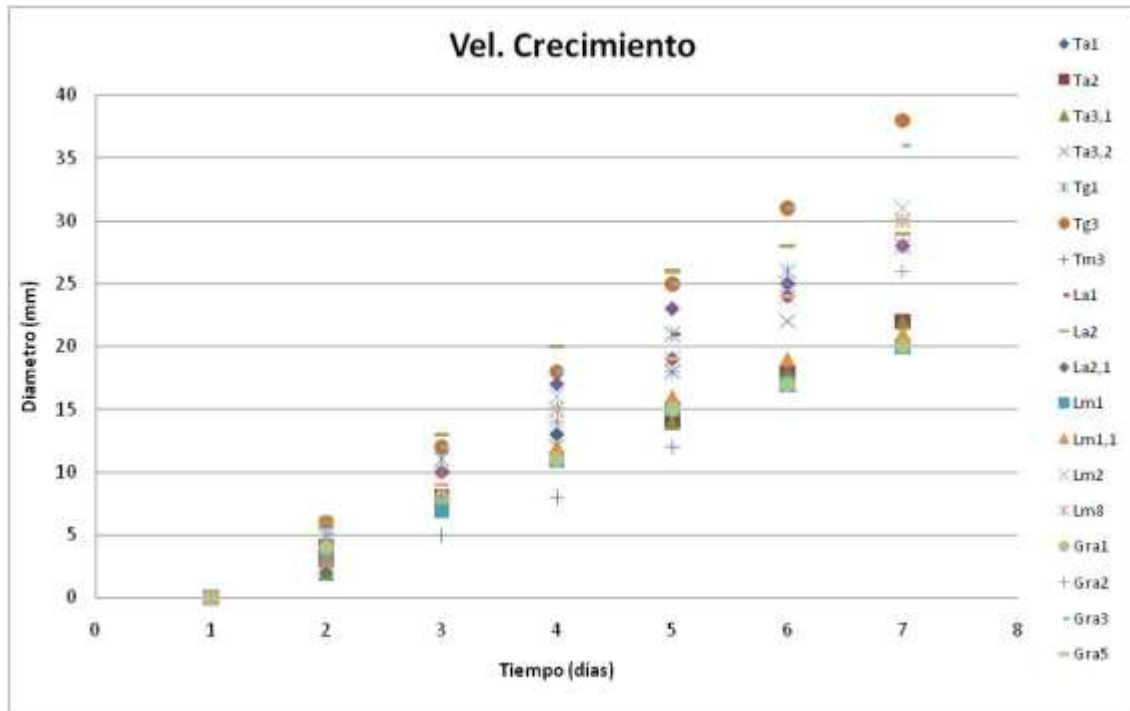


Tabla 9. Análisis de varianza de un factor. Velocidad de crecimiento.

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Tomate de árbol	6	27,79996853	4,63332809	1,2145054
Lulo	6	26,19994181	4,36665697	0,47621247
Granadilla	3	16,14283352	5,38094451	0,60515708

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,07592379	2	1,03796189	1,28887284	0,311132416	3,88529383
Dentro de los grupos	9,663903523	12	0,80532529			
Total	11,73982731	14				

Tabla 10. Análisis de variancia de un factor. Tiempo de Incubación.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Tomate de árbol	6	7,490031934	1,24833866	0,11981438		
Lulo	6	4,510730846	0,75178847	0,07351121		
Granadilla	3	3,577250712	1,1924169	0,00470528		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,828485785	2	0,41424289	5,09294942	0,02503948	3,88529383
Dentro de los grupos	0,9760385	12	0,08133654			
Total	1,804524284	14				

## Anexo 2. Benomyl

Tabla 1. Sensibilidad al Benomyl

CEPA	% Inhibición 0,5 g/L	% Inhibición 1 g/L	% Inhibición 1,5 g/L
TA1	71,257	74,251	74,850
TA2	68,217	69,767	72,093
TA3,1	71,698	71,698	72,956
TA3,2	60,577	64,103	69,231
TG1	63,478	66,087	84,348
TG3	68,063	70,157	74,869
TM3	69,767	79,070	90,698
LA1	85,811	87,838	92,568
LA2	75,833	80,000	87,222
LA2,1	74,615	80,000	81,538
LM1	71,963	72,897	75,701
LM1,1	63,158	64,912	63,158
LM2	65,909	81,818	87,121
LM8	70,370	77,778	79,259
GRA1	66,667	74,510	77,451
GRA2	68,605	72,674	77,326
GRA3	80,000	84,571	87,429
GRA5	33,799	37,989	64,804

Tabla 2. DL50

<b>CEPA</b>	<b>DL50</b>
TA1	0,183
TA2	0,213
TA3,1	0,177
TA3,2	0,307
TG1	0,297
TG3	0,221
TM3	0,224
<b>LA1</b>	<b>0,082</b>
LA2	0,158
LA2,1	0,160
LM1	0,179
LM1,1	0,255
LM2	0,260
LM8	0,199
GRA1	0,239
GRA2	0,218
GRA3	0,120
<b>GRA5</b>	<b>1,019</b>

Tabla 3. Análisis de varianza de un factor. DL50

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Tomate de árbol	6	1,438989124	0,23983152	0,00264719
Lulo	6	1,210867053	0,20181118	0,00208642
Granadilla	3	1,356494628	0,45216488	0,24305556

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,132784227	2	0,06639211	1,56284408	0,24934268	3,88529383
Dentro de los grupos	0,509779173	12	0,0424816			
Total	0,6425634	14				

### Anexo 3. Proteasa

Tabla 1. Prueba de la Proteasa

CEPA	1	2	3
TA1	Positivo	Positivo	Positivo
TA2	Negativo	Negativo	Negativo
TA3,1	Negativo	Negativo	Negativo
TA3,2	Positivo	Positivo	Positivo
TG1	Positivo	Positivo	Positivo
TG3	Positivo	Positivo	Positivo
TM3	Positivo	Positivo	Positivo
LA1	Positivo	Positivo	Positivo
LA2	Positivo	Positivo	Positivo
LA2,1	Positivo	Positivo	Positivo
LM1	Positivo	Positivo	Positivo
LM1,1	Positivo	Positivo	Positivo
LM2	Positivo	Positivo	Positivo
LM8	Positivo	Positivo	Positivo
GRA1	Positivo	Positivo	Positivo
GRA2	Positivo	Positivo	Positivo
GRA3	Positivo	Positivo	Positivo
GRA5	Negativo	Negativo	Negativo

### Anexo 4. Patogenicidad Cruzada

Tabla 1. Patogenicidad Cruzada

CEPAS TOMATE	TG3	TA3,2	TA1	TG1	TM3	TA3,1	TA2	TG1
<b>FRUTALES</b>								
TOMATE CON HERIDAS	6 Día	6 Día	6 Día	6 Día	8 Día	8 Día	8 Día	8 Día
TOMATE SIN HERIDAS	x	22 Día	x	11 Día	x	x	x	x
LULO CON HERIDAS	11 Día	22 Día	22 Día	11 Día	11 Día	22 Día	22 Día	x
LULO SIN HERIDAS	x	x	x	x	x	x	x	x
GRANADILLA CON HERIDAS	11 Día	11Día	x	22 Día	11 Día	22 Día	22 Día	22 Día
GRANADILLA SIN HERIDAS	22 Día	x	22 Día	x	22 Día	22 Día	22 Día	x
<b>CEPAS LULO</b>								
<b>FRUTALES</b>	LM2	LA2	LA2,1	LM8	LM1,1	LA1	LM1	
TOMATE CON HERIDAS	6 Día	6 Día	11 Día	6 Día	6 Día	6 Día	6 Día	
TOMATE SIN HERIDAS	11 Día	22 Día	22 Día	22 Día	22 Día	22 Día	22 Día	
LULO CON HERIDAS	6 Día	11 Día	6 Día	11 Día	11 Día	x	11 Día	
LULO SIN HERIDAS	x	x	x	x	x	x	x	
GRANADILLA CON HERIDAS	22 Día	x	22 Día	22 Día	22 Día	22 Día	22 Día	
GRANADILLA SIN HERIDAS	22 Día	22 Día	22 Día	22 Día	x	x	22 Día	
<b>CEPAS GRANADILLA</b>								
<b>FRUTALES</b>	GRA3	GRA1	GRA2	GRA5				
TOMATE CON HERIDAS	6 Día	6 Día	6 Día	6 Día				
TOMATE SIN HERIDAS	11 Día	11 Día	x	11 Día				
LULO CON HERIDAS	22 Día	x	x	22 Día				
LULO SIN HERIDAS	x	x	x	x				
GRANADILLA CON HERIDAS	11 Día	22 Día	11 Día	22 Día				
GRANADILLA SIN HERIDAS	22 Día	22 Día	22 Día	22 Día				