

22093

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

2007

H20

**CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSANTE DE LA ANTRACNOSIS EN
TOMATE DE ÁRBOL, MANZANO Y MORA**

ALEGRIA SALDARRIAGA CARDONA

**UNIVERSIDAD DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA
Manizales, Colombia
2006**


NOTA DE ACEPTACIÓN



JAIRO LEGUIZAMÓN CAICEDO
Ingeniero Agrónomo, Ph.D
Jurado de Tesis



BERNARDO VILLEGAS ESTRADA
Ingeniero Agrónomo, M.Sc
Jurado de Tesis



JAIRO CASTAÑO ZAPATA
Ingeniero Agrónomo, Ph.D
Presidente de Tesis

DEDICATORIA

A la vida que permite sentir, soñar y crear.

A mi familia y en especial a ti Jovita, ejemplo de superación y valor. A mis hermanos Leonel, Rocío y Sor Maria por ser modelos de rectitud, disciplina y amor. A Oscar por su comprensión y apoyo incondicional. A la memoria de las abuelitas Maria y Abeja por ser ejemplo de valor para afrontar y superar los retos de sus vidas. A mi amiga María A. por su constante compañía comprensión y ayuda.

A ti Mabelita, hija mía, por llenar mi vida de amor, esperanza y razones para vivir.

A Edilberto, por estar presente en mis aciertos y en la superación de mis desaciertos.

A ti Martica, compañera y amiga, a tu memoria, por el tiempo compartido, por tu bondad, cariño y honestidad.

Y por último a ti papá, que aunque no estés físicamente conservo intacta tu imagen en mis paisajes. "A ti que eras nube si mirabas las nubes, y eras flor y luna y estrella distante. Corías en el río verdecías en los montes, eras brioso en la potrancia y manso en los terneros mamantones, creías en el hombre y en todas las criaturas, acariciabas la áspera corteza de los robles y pesabas en tus manos la dulce dimensión de las frutas recreabas el mundo con tu mirada nueva y propiciabas el vigor de la piedra y la montaña". . . . El sabía que iba a morir. . . .

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Jairo Castaño Zapata, Ph.D. en Fitopatología, Director de tesis, por sus enseñanzas, colaboración técnica y apoyo humano. Universidad de Caldas, Manizales.

Al Doctor Rafael Arango Isaza, Ph.D. en Biología molecular, por sus aportes en la orientación del trabajo. Corporación para investigaciones Biológicas (CIB), Medellín.

Al Doctor Carlos Jaime Tobón Yépes, M.Sc. por sus aportes y orientación en el trabajo estadístico. CORPOICA, C.I. El Nus (Antioquia).

Al Doctor Edilberto Lagos Roa, M.Sc. en Fisiología Vegetal, por la revisión y sugerencias hechas al documento.

Al Doctor Edgar Martínez Granja, Ph.D. en Fitopatología, por su gestión y apoyo como mi tutor en CORPOICA.

A la Doctora Irene Perea, Bióloga Ph.D. por sus enseñanzas y recomendaciones. CIB, Medellín.

A la Doctora María José Botero, M.Sc. por sus aportes, recomendaciones y hospitalidad.

Un agradecimiento muy especial a mis compañeros Gladis Múnera, Juan Humberto Guarín, Juan Clímaco Hio, Jairo Osorio, Marta Londoño, Marta Gallego y Mery Escobar por los aportes, solidaridad y apoyo humano.

Un reconocimiento especial a los compañeros de laboratorio: Albeiro Macias, Gloria Cañas, Oneira Marulanda y Rigoberto Vahos.

A Paula Andrea Hernández y Mabel Urrea por las sugerencias, apoyo técnico y humano.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), por el apoyo brindado para la realización de los estudios de Maestría en la Universidad de Caldas.

A la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), por el apoyo brindado para la realización del trabajo en sus laboratorios.

A la Universidad de Caldas especial gratitud por su contribución a mi formación académica y personal.

A mi familia que de una u otra forma contribuyeron para el logro de éste proyecto.

A todas las personas e instituciones que hicieron posible con su apoyo y colaboración la realización del trabajo.

RESUMEN

La Antracnosis es una enfermedad que se presenta tanto en precosecha como en postcosecha y puede llegar a ocasionar, en Colombia, pérdidas superiores al 50% en cultivos de tomate de árbol [*Cyphomandra betacea* (cav.) Sendt.], manzano (*Malus domestica* Borkh.), y mora (*Rubus glaucus* Benth.). Se ha reportado tradicionalmente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc., como el agente causante de la Antracnosis en éstos frutales. El manejo de esta enfermedad se fundamenta en el uso de productos químicos y la realización de prácticas culturales, método que ha resultado poco eficiente. La necesidad de conseguir un manejo más eficiente de esta enfermedad ha motivado la realización de estudios básicos orientados hacia un mayor conocimiento de los aspectos biológicos del hongo, estudios de diagnóstico y caracterización de las especies, entre otros. Tales conocimientos del organismo permitirían inferir sobre los patrones de comportamiento de la especie o del grupo taxonómico, y facilitarían el desarrollo de alternativas tecnológicas para estructurar planes de manejo de la enfermedad.

El presente trabajo se llevó a cabo en las zonas productoras de los departamentos de Antioquia y Caldas, con el propósito de contribuir a la caracterización del agente causante de la Antracnosis, para lo cual se realizaron muestreos en huertos comerciales de éstos frutales que presentaban síntomas de la enfermedad. Los aislamientos del hongo obtenidos en el laboratorio fueron probados en su patogenicidad y caracterizados mediante color de las cepas, tasa de crecimiento, aspecto del micelio, tamaño y forma de las conidias. La caracterización morfológica se complementó con un diagnóstico molecular con PCR usando oligonucleótidos específicos y protocolos ajustados.

Se encontró que existe alta variabilidad dentro y entre los aislamientos en lo referente a los caracteres morfológicos de las cepas, como el color, el aspecto y tipo de micelio, además de inestabilidad de los rasgos fenotípicos a medida que las cepas crecían, colonizaban el medio de cultivo y envejecían. Igualmente, el tamaño y forma de las conidias también presentaron variaciones e inestabilidad, que no permitieron un claro establecimiento de patrones de diferenciación entre los aislamientos.

Los caracteres morfológicos no permitieron establecer diferencias contundentes, entre los aislamientos del hongo procedentes de las diferentes localidades y hospedantes, presentándose traslapes que impidieron conformar grupos por localidad o por hospedante. Dichos traslapes también se extendieron a las cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* y de *Colletotrichum acutatum*, empleadas como cepas de referencia para éstas dos especies del hongo.

Mediante el desarrollo y ajuste de protocolos para el incremento y purificación del hongo, extracción del ADN y usando oligonucleótidos específicos en un protocolo de PCR diagnóstica, se pudo detectar el hongo *C. acutatum* causando Antracnosis en frutos de tomate de árbol, manzana, y en ramas de mora. También fue posible diferenciar las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* aisladas de éstos frutales, constituyéndose estos logros en una herramienta para continuar los estudios en el complejo *Colletotrichum* en los frutales de clima frío moderado.

Palabras claves: Antracnosis, caracterización, *Colletotrichum*, Tomate de árbol, mora, manzano.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 GENERAL	4
2.2 ESPECÍFICOS	4
3. JUSTIFICACIÓN	5
4. HIPÓTESIS	8
5. REVISIÓN DE LITERATURA	9
5.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS SOBRE LA TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Colletotrichum</i>	9
5.2 ANTECEDENTES SOBRE LA ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL, MORA Y MANZANO EN COLOMBIA	27
5.3 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN EN EL GÉNERO <i>Colletotrichum</i>	33
5.4 ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL GÉNERO <i>Colletotrichum</i>	48
5.5 SÍNTOMAS OCASIONADOS POR <i>Colletotrichum</i> EN FRUTOS DE TOMATE DE ÁRBOL (<i>Cyphomandra betacea</i> (CAV.) SENDT.), MANZANO (<i>Malus domestica</i> BORKH) Y EN RAMAS DE MORA (<i>Rubus glaucus</i> BENTH.).	56
6. MATERIALES Y MÉTODOS	60
6.1 LOCALIZACIÓN Y MUESTREO EN CAMPO	60
6.2 METODOLOGÍA	61
6.2.1 Primera etapa. Elaboración del cepario: codificación, aislamiento y conservación de las cepas de <i>Colletotrichum</i>	62
6.2.2 Segunda etapa: Obtención de cultivos monospóricos, pruebas de patogenicidad y estudios biológicos para caracterización morfológica de los aislamientos	63
6.2.2.1 Cultivos monospóricos	63
6.2.2.2 Pruebas de patogenicidad	64

6.2.2.3	Caracterización morfológica de los aislamientos	67
6.2.3	Tercera etapa: Realización de los diagnósticos moleculares mediante PCR y uso de cebadores específicos	69
6.2.3.1	Crecimiento del hongo	69
6.2.3.2	Extracción del ADN y cuantificación	69
6.2.3.3	PCR diagnóstica	71
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
7.1	PRIMERA ETAPA: ELABORACIÓN DEL CEPARIO: CODIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE COLLETOTRICHUM	73
7.2	SEGUNDA ETAPA: OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS, PRUEBAS DE PATOGENICIDAD Y ESTUDIOS BIOLÓGICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS	75
7.2.1	Obtención de cultivos monospóricos	75
7.2.2	Pruebas de patogenicidad	76
7.2.3	Caracterización morfológica de los aislamientos	84
7.3	TERCERA ETAPA: REALIZACIÓN DE LOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES MEDIANTE PCR Y USO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS	103
7.3.1	Crecimiento del hongo	103
7.3.2	Extracción y cuantificación del ADN	104
7.3.3	PCR diagnóstica	105
8.	CONCLUSIONES	110
9.	RECOMENDACIONES	112
	BIBLIOGRAFÍA	113
	ANEXOS	141

TABLAS

	Pàg.
Tabla 1. Identificación y codificación de las muestras colectadas.	74
Tabla 2. Resultados de las pruebas de patogenicidad.	78
Tabla 3. Diámetro de las lesiones de Antracnosis en frutos de tomate de árbol a los 22 días de la inoculación.	81
Tabla 4. Diámetro de las lesiones de Antracnosis en frutos de manzana a los 22 días de la inoculación.	82
Tabla 5. Aislamientos seleccionados para caracterización morfológica.	85
Tabla 6. Resultados de la caracterización morfológica.	91
Tabla 7. Aislamientos seleccionados para diagnóstico molecular.	104

FIGURAS

	Pàg.
Figura 1. Aspecto de las lesiones a los 22 días de la inoculación.	79
Figura 2. Síntomas de Antracnosis en ramas de mora a los 80 días de la inoculación.	83
Figura 3. Coloración de las cepas a los 10 días de crecimiento en PDA-acidificado.	86
Figura 4. Formación de apresorios.	88
Figura 5. Estructuras similares a vesículas.	89
Figura 6. Morfología de las conidias.	101
Figura 7. PCR diagnóstica para <i>C. gloeosporioides</i> .	106
Figura 8. Productos amplificados con los oligonucleótidos ITS1-ITS4.	107
Figura 9. Productos amplificados con los oligonucleótidos Calnt-ITS4.	108

ANEXOS

	Pàg.
Anexo 1. Especies de <i>Colletotrichum</i> patógenas o asociadas con plantas de interés económico para la agricultura Colombiana.	141
Anexo 2. Procedimiento para la calibración del ocular micrométrico.	150
Anexo 3. Procedimiento para la elaboración de los microcultivos.	152
Anexo 4. ANOVA y prueba de Duncan para la variable diámetro de las lesiones de Antracnosis en frutos de tomate de árbol y manzana a los 22 días de la inoculación.	154
Anexo 5. ANOVA y prueba de Duncan para la variable diámetro de lesiones de Antracnosis en frutos de manzana a los 22 días de la inoculación.	156
Anexo 6. Análisis de varianza para la variable tasas de crecimiento (cm/día) y pruebas de comparación de Duncan y Tukey.	166
Anexo 7. Análisis de varianza y pruebas de Duncan y Tukey para las variables largo y ancho de conidias.	170
Anexo 8. Principales aspectos taxonómicos biológicos y morfológicos de <i>Colletotrichum acutatum</i> .	179

INTRODUCCIÓN

Con el nombre de Antracnosis se conoce una enfermedad que se manifiesta mediante lesiones necróticas de diferentes tamaños, redondeadas que pueden aparecer en hojas, tallos y frutos. La enfermedad es causada por hongos que producen sus conidias en acérvulos, característica de los hongos del orden Melanconiales.

Dicha enfermedad es de común ocurrencia en el trópico y en zonas templadas, en donde afecta un amplio rango de plantas y es causada por especies del género *Colletotrichum* y se considera de importancia económica por las pérdidas que ocasiona en los cultivos en campo y en los frutos en postcosecha.

Colletotrichum es un hongo con 39 especies aceptadas en el género, que continúan en revisión para aclarar su taxonomía mediante técnicas moleculares.

En Colombia, la especie *Colletotrichum gloeosporioides* ha sido considerada de importancia económica en frutales de clima frío moderado como tomate de árbol, lulo, mora, granadilla y curuba, registrándose pérdidas superiores al 50%.

La Antracnosis en tomate de árbol y mora ocasiona pérdidas que oscilan entre 50-75%, constituyéndose en la enfermedad más limitante de estos cultivos, a pesar de la aplicación de productos químicos para el control. Esto ha motivado a que se realicen estudios básicos en diferentes temas, entre éstos: los aspectos

biológicos, el diagnóstico de las especies por diferentes métodos, y últimamente mediante el uso de herramientas de biología molecular. También se estudian aspectos como la taxonomía del hongo, la epidemiología de la enfermedad y la exploración de alternativas y métodos para el control.

Este trabajo se planificó con el propósito de obtener un mayor conocimiento del hongo causante de la Antracnosis que afecta los cultivos de tomate de árbol, mora y manzano en los departamentos de Antioquia y Caldas. El conocimiento del patógeno, su diversidad y composición poblacional son aspectos fundamentales para el planteamiento de posteriores estudios tendientes a estructurar planes de manejo y control de la enfermedad. Se propuso inicialmente caracterizar morfológicamente y por técnicas moleculares el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc., reportado tradicionalmente en Colombia como el agente causante de la Antracnosis del fruto del tomate de árbol, las ramas de la mora de castilla y el fruto del manzano.

Durante el desarrollo del trabajo se pudo comprobar la existencia de una amplia variabilidad de los caracteres morfológicos dentro y entre los aislamientos procedentes de los diferentes hospedantes, como también la superposición de caracteres morfológicos y fenotípicos, lo cual dificultó el diagnóstico de la especie haciéndolo poco confiable por los métodos morfológicos. Ante esta situación y para corroborar la especie se realizó el diagnóstico molecular mediante la técnica PCR y el uso de oligonucleótidos específicos para *C. gloeosporioides*, obteniéndose resultados negativos para esta especie. Este resultado obligó a realizar pruebas adicionales a los ADN de los diferentes aislamientos para establecer que no estuvieran degradados, lo cual se comprobó mediante el uso de los oligonucleótidos ITS1-ITS4; El resultado anterior a replantear el trabajo molecular e iniciar estudios tendientes a determinar la especie o especies

patogénicas del hongo presentes en el cepario objeto de esta investigación. Fue necesario desarrollar y ajustar protocolos de PCR empleando nuevos oligonucleótidos para el diagnóstico de otras especies de *Colletotrichum* registradas como patógenas a nivel mundial en los cultivos de manzano, tamarillo y mora. De esta forma se llegó a determinar que la especie *C. acutatum* se encuentra causando Antracnosis en frutos de tomate de árbol y manzano, como también en tallos de mora en los cultivos muestreados en los departamentos de Antioquia y Caldas.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

- Contribuir al conocimiento de *Colletotrichum* spp. procedentes de tomate de árbol [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.], mora (*Rubus glaucus* Benth.) y manzano (*Malus domestica* Borkh.).

2.2 ESPECÍFICOS

- Mediante el uso de caracteres morfológicos describir el comportamiento *in vitro* de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de los frutales mencionados, registrando características del cultivo como color, tasa de crecimiento, tipo de micelio, como también tamaño y forma de conidias, presencia de setas, esclerocios y clamidosporas, entre otros.
- Complementar con técnicas de biología molecular los estudios morfológicos tendientes a la caracterización de los aislamientos patogénicos obtenidos de los frutales en estudio.

3. JUSTIFICACIÓN

Según Corpoica (1996a), en Colombia se podría regionalizar o especializar la producción frutícola por zonas geográficas o climáticas, según las especies y contribuir al desarrollo de este sector agrícola, siempre y cuando se acompañe con una política estatal de apoyo a la producción, al mercadeo y a la inversión en infraestructura e investigación.

Los cultivos como tomate de árbol, lulo y mora son de gran importancia socioeconómica en Antioquia, y el Eje Cafetero, si se tiene en cuenta las áreas sembradas, los rendimientos y el valor de las producciones (Corpoica, 1997). De estos cultivos, el tomate de árbol y la mora tienen bastante acogida y aceptación en el mercado nacional y buen potencial para la exportación (Salazar, 1988). El tomate de árbol se considera una alternativa socioeconómica en zonas de clima frío moderado, especialmente en los departamentos de Antioquia, Caldas y Cundinamarca (Rondón, 1999; Rondón, Páez y Zuluaga, 1999).

En éstos frutales existen limitantes, entre los cuales se encuentran los de carácter biológico que dificultan la producción. Uno de estos grandes limitantes es la enfermedad denominada Antracnosis, producida por el hongo *Colletotrichum* spp., la cual causa pérdidas cuantiosas y altos costos en los controles químicos (Osorio, 2003). Por otra parte, Rondón (1999), como también Rondón, Páez y Zuluaga (1999), han considerado que los productos químicos empleados son ineficientes, afectan negativamente el ambiente y el producto cosechado. Osorio (2003), menciona que en 8.000 ha de la zona andina, en cultivos de tomate de árbol y

mora, las pérdidas ocasionadas por la Antracnosis fluctúan entre un 50% y un 75% de la producción.

En el caso del cultivo de la mora, Castro *et al.* (1995), reportan que en 1.992 la Antracnosis destruyó plantaciones de este cultivo en el Oriente antioqueño. Botero *et al.* (2003) y Cadavid *et al.* (1994), consideran que la Antracnosis es una enfermedad detrimental en el cultivo de la mora, causando pérdidas tanto en precosecha como en poscosecha.

En el departamento de Caldas, Salazar, Castaño y Castaño (1997), reportaron esta enfermedad en frutos de manzano. En predios cultivados con manzano, según Salazar (1998) y Salazar (1996), se detectó y consideró la Pudrición amarga del fruto (*Glomerella cingulata* (Stonem.) Spaulding and Von Schrenk) como una enfermedad de importancia potencial.

El conocimiento de este patógeno, su variabilidad y composición poblacional son aspectos de gran importancia que pueden tener relación con la patogenicidad y con el desarrollo epidémico de la Antracnosis en las zonas productoras de estos cultivos. Estos conocimientos son básicos para adelantar posteriores estudios relacionados con la generación de alternativas tecnológicas para el manejo integrado de la enfermedad (Corpoica, 1996b).

Según Corpoica (1998), la identificación correcta de un organismo permite conocer los patrones de comportamiento de la especie o de grupos taxonómicos y facilita el acceso a la información científica y técnica que se ha generado tanto a nivel

nacional como internacional. A este conocimiento se llega mediante la caracterización morfológica, biológica, bioquímica o molecular de las especies, de acuerdo con las herramientas que se dispongan.

4. HIPÓTESIS

Ho : No existen diferencias entre los aislamientos de *Colletotrichum* spp. involucrados en el estudio.

Hi : Existen diferencias entre los aislamientos de *Colletotrichum* spp. involucrados en el estudio.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS SOBRE LA TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Colletotrichum*

En una revisión bibliográfica realizada por Sutton (1992), este autor hace las siguientes consideraciones: ...la historia taxonómica de *Colletotrichum* ha involucrado otros géneros descritos como Deuteromycetes, existiendo por lo menos 11 sinónimos genéricos. Algunos de estos son sinónimos taxonómicos y otros son sinónimos de nomenclatura. Cerca de 900 especies han sido asignadas al género *Colletotrichum*. En los últimos 200 años los sistemas para identificación han evolucionado, considerando aspectos morfológicos combinados con la relación patógeno hospedante, y rango de hospedantes.

...Históricamente han existido diversas opiniones acerca de los límites genéricos de *Colletotrichum*. A pesar de las claras ilustraciones y del diagnóstico original hecho por Corda (1837a), el género ha sido considerado bajo diferentes nombres. En la actualidad se estima que existen unos 17 sinónimos genéricos para *Colletotrichum*.

...Entre los hongos que actualmente son conocidos como *Colletotrichum* se encuentra *Vermicularia* cuya descripción fue hecha por Tode (1790). Fue en este año cuando se iniciaron las primeras informaciones acerca de hongos conocidos actualmente como *Colletotrichum*. La nomenclatura del grupo que contenía *Colletotrichum* se aplicó a partir de 1821 bajo las reglas del Código Internacional

de Nomenclatura Botánica de Agosto de 1981. Fries (1821 - 1832) fue la autoridad de validación para los nombres publicados antes de 1821.

...Durante los siglos XIX y XX los nombres de *Colletotrichum* y *Vermicularia* se usaron de manera intercambiada para especies que hoy día son aceptadas en *Colletotrichum*. Wollenweber y Hochapfel (1949), ubicaron las especies de esporas curvas en *Vermicularia*, y las especies de esporas rectas en *Colletotrichum*. Clements y Shear (1931), los distinguieron por la distribución de las setas así: setas marginales *Colletotrichum* y setas dispersas en el cuerpo fructífero *Vermicularia*. Otros autores han separado estos hongos basados en que *Vermicularia* posee picnidio y *Colletotrichum* acérvulo. Grove (1937), asumió que las setas en *Colletotrichum* no eran esenciales pero sí en *Vermicularia*; Duke (1928), aclaró la confusión demostrando que la estructura y forma del cuerpo fructífero, así como la disposición, presencia o ausencia de setas, son caracteres extremadamente variables y sin ningún significado en el ámbito genérico. Esto generó que un gran número de especies cambiara sus nombres de *Vermicularia* a *Colletotrichum*.

...En el género *Gloeosporium* Desm. & Mont., cerca de 750 especies han sido descritas. Este género se consideró cercano a *Colletotrichum* y tuvo como base la presencia o ausencia de setas; los que no poseían setas se ubicaban en *Gloeosporium*, y los que las poseían en *Colletotrichum*. Sin embargo, la asociación de *Gloeosporium* con *Colletotrichum* fue basada en una premisa falsa. Von Arx (1957b) demostró que las especies tipo *Gloeosporium*, como *Gloeosporium castagnei* (Desm. & Mont.), son especies de *Marssonina*, *Marssonina castagnei* (Desm. & Mont.) y no tienen relación con *Colletotrichum*.

...La ausencia de setas en algunas especies de *Colletotrichum* en parte debe ser controlada genéticamente, puesto que especies como *Colletotrichum musae* y *Colletotrichum gossypii* Southw. var. *cephalosporioides* A.S. Costa, frecuentemente fallan en producirlas (Sutton y Waterston, (1970). ...Como resultado de estos trabajos, muchas especies de *Gloeosporium* se ubicaron en otro género. Aunque otras se transfirieron a *Colletotrichum* como especies diferentes, y la mayoría han sido reducidas a sinónimos de especies ya conocidas. Las condiciones ambientales también juegan un papel en la producción de setas, siendo muy importante la humedad atmosférica (Frost, 1964).

El género *Dicladium* Cesati (1852); fué introducido como especie única en *Dicladium graminicola* Cesati. La especie tipo fue puesta en *Vermicularia* por Westendorp (1861), más tarde Saccardo (1886) lo ubicó en *Steirochaete*. ...Wilson (1914), trabajando en gramíneas lo refirió a *Colletotrichum*. Los investigadores Vassiljevsky y Karakulin (1950), retomaron el género *Dicladium*, basados en la forma como se origina el cuerpo fructífero, el cual inicia su formación entre la pared celular superior de la epidermis y la cutícula del hospedante, involucrando la salida de hifas que rompen la pared superior de la epidermis. Sutton (1966), demostró que desarrollos similares ocurrían en *Colletotrichum capsici* en *ananas*, en *Colletotrichum dematium* y en *Colletotrichum gloeosporioides* sobre sustrato graminícola; mientras que en sustrato no graminícola estas especies producen un estroma que puede ser epidermal o subepidermal el cual rompe la epidermis sobresaliendo, sin involucrar salida de hifas, por lo cual no hay razón para mantener a *Dicladium* como un género separado de *Colletotrichum*.

...*Ellisiella* fue introducido como género por Saccardo (1889), y se mantuvo separado de *Colletotrichum* considerando la extensión del apéndice conidial en *Ellisiella*; sin embargo, el desarrollo del cuerpo fructífero es idéntico al de especies

de *Colletotrichum graminicola*. Aunque la morfología conidial es la única de este tipo en el género, el comportamiento biológico de *Ellisiella caudata* Peck ex Sacc., permite a Sutton (1966) sugerir que es más correcto colocar el género en *Colletotrichum* como *Colletotrichum caudatum*.

En otro documento, Sutton (1980), hace una revisión sobre los hongos de los Coelomycetes y anota que las especies: *Colletotrichum caudatum* (Sacc.) Pk (1909), *Ellisiella caudata* Sacc. (1880), *Ellisiella caudata* (Sacc.) Camara (1949), *Rostrospora ciliata* (T.S. & K. Ramakr. (1952) y *Colletotrichum ciliatum* T.S. & K. Ramakr. (1947), han sido fuente de confusión tanto en nomenclatura como en taxonomía desde el comienzo. Arx (1957b) citado por Sutton (1980), las incluyó como sinónimo de *Colletotrichum graminicola*, pero el apéndice apical permite separarlas fácilmente. Si se considera el apéndice conidial para justificar la segregación del taxón en un género distinto, se debería retomar *Ellisiella*; pero como Sutton sugirió en 1966 y Nag Raj demostró en 1973, estas especies de *Ellisiella* son biológicamente indistinguibles de las especies de *Colletotrichum*.

Continuando con la revisión de Sutton (1992), otros sinónimos genéricos conocidos para *Colletotrichum* son: *Steirochaete* Braun & Caspari, cuya especie tipo fue transferida a *Colletotrichum* por Southworth (1890b). Posteriormente von Arx (1957a), la consideró un sinónimo de *Colletotrichum gloeosporioides*; el género *Gloeosporiopsis* Speg., Petrak y Sydow (1935), pensaron que era idéntico a *Colletotrichum*. Respecto a *Colletotrichopsis* Bubak., las setas periféricas constituyentes de la pared picnidial fueron un distintivo entre éste y *Colletotrichum*. Sin embargo, von Arx (1957a), refirió la especie a *Colletotrichum*. Igualmente *Colletostroma* Petrak., también se convirtió en otro sinónimo de *Colletotrichum*. La mayoría de estos géneros tenían muy pocas especies.

La taxonomía de *Colletotrichum* no es muy clara, por lo menos 11 sinónimos genéricos han sido conocidos y descritos; además de 900 especies descritas y asignadas a *Colletotrichum*. Para *Colletotrichum gloeosporioides* se han citado cerca de 600 sinónimos (Sutton, 1992). Para *Glomerella* se han tenido 120 sinónimos (Arx & Müller, 1954, citados por Sutton, 1980).

En *Colletotrichum*, la identificación se ha basado en caracteres morfológicos, culturales, especialmente características conidiales (forma, tamaño), presencia de setas, esclerocios y forma del apresorio entre otros (Adaskaveg y Hartin, 1997; Sutton, 1992).

Nuevamente Sutton (1992), en su revisión reporta que los aspectos taxonómicos de *Colletotrichum* son confusos; el número de claves disponibles para la identificación ha sido limitado. Von Arx (1957a) ubicó 23 taxa; más tarde en 1981 las incrementó a 25; Sutton (1980) ubicó 22, Baxter (1983) 11, y Baxter y van der Westhuizen (1984) 12. Existe traslape entre las especies incluidas, pero no existe un manual que acepte todas las taxa y la información que se usa para la identificación es variable. Von Arx (1957a), Sutton (1980) y Baxter (1983), suministraron claves dicotómicas acompañadas de ilustraciones y descripciones. Von Arx (1981), suministró una clave dicotómica y Baxter y van der Westhuizen (1984), suministraron una clave sinóptica, pero ambas carentes de datos retrospectivos; además de lo anterior se dieron tratamientos de taxa individuales o se trabajó con grupos pequeños de taxa; es así como a partir de tales fuentes existen ahora 39 especies de *Colletotrichum* aceptadas las cuales no deben ser consideradas definitivas, sino que deben ser vistas en función de establecimiento del estado actual. Estas especies según Sutton (1992) son:

- 1) *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds: se caracteriza por poseer colonias blancas que se tornan de colores grises a café oscuro; esclerocios ausentes, apresorios de color café claro a oscuro, irregulares, y conidias de 8.5-16.5 x 2.5-4 μ m, formadas en masas de color salmón rosado a naranja. Se diferencia de *C. gloeosporioides* por su baja tasa de crecimiento. *C. acutatum* posee las taxas fisiológicas *C. acutatum* f. sp. *pineum*, y *C. acutatum* f. sp. *chromogenum*.
- 2) *C. capsici* (H. Syd.) E. Buti. & Bisby, posee colonias densas de color blanco a gris oscuro, esclerocios ausentes, setas abundantes, apresorios de color café formando largas cadenas irregulares, y conidias de 18-23 x 3.5-4 μ m, formadas en masas de color pálido a salmón.
- 3) *C. caricae* Stev. & Hall. No se poseen mayores detalles sobre el comportamiento de esta especie en medios de cultivo. Las conidias miden entre 9-20 x 3.5-6 μ m, se forman en masas rosadas en acérvulos, presenta setas, y los apresorios son de color verde oscuro.
- 4) *C. caudatum* (Sacc.) Peck., presenta colonias densas de color pálido a café vináceo, micelio aéreo, setas abundantes, esclerocios ausentes, apresorios en forma de clavo, u ovalados, y conidias falcadas, fusiformes de 18.5-24 x 3.5-4 μ m, con ápice prolongado formando un apéndice celular no ramificado. La especie se distingue de otras especies de *Colletotrichum* por el apéndice de la conidia.
- 5) *C. circinans* (Berk.) Voglino, presenta colonias café oscuras, micelio aéreo, conidias de 19-21 x 3.5 μ m, fusiformes, formadas en masas de color ocre, setas abundantes, presencia de esclerocios globosos, y apresorios irregulares.
- 6) *C. coccodes* (Wallr.) S. Hughes, se caracteriza por poseer colonias con micelio aéreo blanco, abundantes esclerocios globosos de color negro, presentan abundantes setas y apresorios de color canela a café, y conidias con dimensiones

entre 16-24 x 3-4 μ m, rectas, fusiformes, formadas en masas de color naranja, naranja salmón.

7) *C. coffeanum* Noack., presenta colonias con baja tasa de crecimiento, micelio aéreo de color gris oscuro a verde oliva, setas muy escasas o ausentes, esclerocios ausentes, apresorios alargados y de color café claro, y conidias rectas, cilíndricas, con dimensiones entre 12.5-19 x 4 μ m. Dichas conidias se forman en hifas no en cuerpo fructífero.

8) *C. corchori* Ikata & Tanaka, presenta colonias variables, con micelio blanco a gris, forma esclerocios en la periferia de las colonias cuando estas envejecen, presenta setas, apresorios abundantes y algunas veces complejos, y conidias falcadas, fusiformes, con dimensiones entre 14.5-19.5 x 3.5-4 μ m, formadas en masas amarillas.

9) *C. crassipes* (Speg.) von Arx, presenta colonias de colores variables que van desde rosadas hasta grises y cafés, esclerocios ausentes, setas abundantes, apresorios de color café, y conidias con dimensiones entre 14-28 x 5-7 μ m, rectas, cilíndricas, con ápice obtuso, formadas en masas de color crema a naranja pálido.

10) *C. curvatum* Briant & Martyn, presenta colonias con micelio gris a blanco, setas presentes, y conidias con dimensiones de 16-22 x 3.5 μ m, fusiformes con puntas agudas, las cuales se forman dentro de masas de color rosado.

11) *C. dematium* (Pers. Fr.) Grove, produce colonias de un amplio rango de pigmentaciones, setas abundantes, esclerocios abundantes y de color negro, apresorios cafés e irregulares, y conidias de 18-26 x 2-3 μ m, falcadas, fusiformes, formadas en masas de color gris oliva a salmón vinaceo.

12) *C. destructivum* O' Gara, cuyo telemorfo es *Glomerella glycines* Lehman & Wolf, presenta colonias de color salmón ocre en el centro, márgenes incoloras a rosa pálido, setas escasas y dispersas, ocasionalmente forma esclerocios, apresorios abundantes, y conidias que van de rectas a un poco curvadas, con dimensiones de 10-22 x 4-6 μ m, las conidias se forman en masas de color naranja.

13) *C. falcatum* Went, cuyo telemorfo es *Glomerella tucumanensis* (Speg.) von Arx & Müller., produce colonias blancas grisáceas con micelio aéreo escaso y pequeñas áreas densas. También existen colonias oscuras con abundante micelio aéreo blanco grisáceo, con poca esporulación, setas escasas, ausencia de esclerocios, apresorios escasos, de color café, y conidias levemente falcadas, fusiformes, con dimensiones de 15.5-26.5 x 4-5 μ m, formadas en masas de color rosado salmón.

14) *C. fragariae* Brooks, produce colonias de color oliva a gris, gris oscuro a negro, raras veces blancas, presenta setas abundantes y dispersas, esclerocios ausentes, apresorios presentes, conidias de 12.5-16.5 x 4.5-5 μ m, cilíndricas, con ápice obtuso, formadas en masas de color rosado a naranja. La especie ha sido considerada como un sinónimo de *C. gloeosporioides*, específico a fresa (*Fragaria* sp). Sin embargo, Smith y Black (1990) encontraron dificultad para la separación de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*. Von Arx (1957, citado por Gunnell y Douglas 1992), colocó a *C. fragariae* en sinonimia con *C. gloeosporioides*, pero se han continuado registrando como especies separadas.

Según Howard & Albrechts (1983, citados por Gunnell y Douglas 1992), la especie *C. fragariae* es pobremente definida y el nombre ha sido usado para referirse a aislamientos que poseen características semejantes a *C. gloeosporioides* pero que producen conidias más abundantes y no presenta estado telemorfo.

15) *C. fusarioides* (Ell. & Kellerm.) O'Gara, cuyo teleomorfo es *Glomerella fusarioides* Edgert., según Sutton (1992), presenta cuerpos fructíferos entre 200-450 μ m de diámetro con setas escasas o ausentes confinadas en la periferia del cuerpo fructífero, y conidias cilíndricas, rectas a un poco curvas, irregulares formadas en masas de color salmón. No se conocen mayores detalles del comportamiento en medios de cultivo.

16) *C. fuscum* Laub., presenta colonias afelpadas hacia el margen, con crecimiento rápido, de color gris que se torna oscuro y luego negro, con producción abundante de esclerocios, presencia de apresorios y clamidosporas intercalares, y conidias entre 15-21 x 3.5-4 μ m cilíndricas a elipsoides, rectas a un poco curvas.

17) *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., cuyo teleomorfo es *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & von Schrenk., presenta colonias variables de color blanco grisáceo a gris oscuro, micelio aéreo, afelpado, cuerpos fructíferos, setas presentes o ausentes, esclerocios ausentes, cuando el cuerpo fructífero madura puede ser confundido con esclerocios, los apresorios son morfológicamente variables (pueden ser en forma de clavo, en forma de huevo, en forma de huevo invertido, algunas veces lobulados) con colores sepia a café, y conidias con dimensiones de 12-17x 3.5-6 μ m, rectas, cilíndricas, con ápice obtuso, formadas en masas de color salmón pálido. Esta especie es muy heterogénea y en medio de cultivo las características son muy variables. Basados únicamente en la morfología no se han hecho mayores progresos en sistemática e identificación de aislamientos pertenecientes a este complejo.

Este hongo posee las siguientes taxa fisiológicas: *G. cingulata* f.sp. *aeschynomenes* Daniel et al., *G. cingulata* f.sp. *camelliae* Dickens & R. T. A. Cook., *C. gloeosporioides* f.sp. *clidemiae* Trujillo et al., *C. gloeosporioides* f.sp. *cucurbitae* Menten, Kimata & C.P. Costa., *C. gloeosporioides* f.sp. *cuscutae* T. &

Zhang., *C. gloeosporioides* f.sp. *manihotis* Chevaug, teleomorfo *G. cingulata* f.sp. *manihotis* Chevaug.

18) *C. gloeosporioides* var. *minus* Simmonds, cuyo teleomorfo es *G. cingulata* var. *minor* Wollenw., presenta colonias de crecimiento rápido, micelio algodonoso, lanoso, aéreo, blanco a gris, setas presentes, esclerocios ausentes, apresorios irregulares, y conidias de 11-17.5 x 3-5 μ m, rectas, cilíndricas con ápice obtuso, formadas en masas rosadas. Se diferencia de *C. gloeosporioides* por su copioso micelio aéreo, un tamaño conidial promedio de 14 x 3.7 μ m, comparado con 13.8 x 4.8 μ m de *C. gloeosporioides*; y un tamaño de la ascospora de 15.6 x 4.27 μ m., comparado con 18.3 x 5.47 μ m de *Glomerella*.

19) *C. gnaphalii* H. Syd. Especie aceptada como una de las muchas formas de *C. gloeosporioides*; se distingue por sus pequeñas conidias que miden entre 8- 15 x 4-6 μ m.

20) *C. graminicola* (Ces.) Wilson, cuyo teleomorfo es *G. graminicola* Politis, presenta colonias con micelio esponjoso, aéreo, de color gris a café oscuro, esclerocios presentes, setas abundantes, apresorios abundantes de color café con bordes muy irregulares, y conidias falcadas, fusiformes, con dimensiones entre 23.5-29 x 3.5-5 μ m, formadas en masas de color salmón naranja.

21) *C. helichrysi* (Wint.) von Arx, presenta cuerpos fructíferos con conidias rectas, cilíndricas con dimensiones entre 15-19 x 4.5-6 μ m. Se adolece de mucha información en esta especie.

22) *C. higginsianum* Sacc., presenta conidias rectas o un poco curvas, fusiformes, con dimensiones entre 16.5-19 x 4 μ m, en masas de color naranja a canela.

23) *C. liliacearum* Ferr., presenta colonias de color blanco, que se tornan grises con tonalidades rosadas en el medio, volviéndose negras cuando envejecen, setas presentes y abundantes, apresorios no descritos, y conidias de 13-23 x 3.5-5 μ m, falcadas, fusiformes, cerradas gradualmente en las puntas, formadas en masas de color salmón. Esta especie ha tenido una historia confusa.

24) *C. lindemuthianum* (Sacc & Magnus) Briosi & Cav., cuyo telemorfo es *G. lindemuthiana* Shear. (sinónimo *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*), produce colonias inicialmente grises, luego se oscurecen, los micelios aéreos se compactan, hay presencia de setas, ocasionalmente presenta esclerocios, los apresorios son escasos y presentan color canela claro a café oscuro, y las conidias son rectas, cilíndricas, elipsoides, con extremos obtusos y miden entre 9.5-11.5 x 3.5-4.5 μ m, formadas en masas de color salmón pálido a miel. Esta especie difiere de *C. gloeosporioides* en la baja tasa de crecimiento y pigmentación oscura en los cultivos.

25) *C. linicola* Pethybr. & Lafferty, cuyas colonias se caracterizan por el lento crecimiento, son de color café oscuro a negro, con agregados de hifas oscuras, esclerocios ausentes, setas abundantes, apresorios cafés, y conidias rectas, un poco curvadas, fusiformes con dimensiones entre 16-19 x 3-4.5 μ m.

26) *C. malvarum* (Braun & Casp.) Southw., produce colonias con pigmentaciones oscuras pero con margen clara, setas abundantes, esclerocios y apresorios no descritos, y conidias de 12-24 x 4-6 μ m, rectas, un poco irregulares, cilíndricas a elipsoides, formadas en masas de color rosado pálido. Von Arx (1981) incluye esta especie como específica de la familia Malvaceae, pero bajo el nombre de *C. gloeosporioides*.

27) *C. musae* (Berk. & M.A. Curtis) von Arx, cuyo telemorfo es *G. musarum* Petch., presenta colonias con abundante micelio aéreo, blanco que se va tornando gris a

medida que envejece, no presenta setas ni esclerocios, apresorios abundantes de color café, y conidias rectas cilíndricas, con dimensiones entre 12-17 x 4.5-5.5µm, formadas en masas de color canela -ocre. Von Arx (1981) la incluyó en *C. gloeosporioides* como específica a *Musa* sp.

28) *C. nigrum* Ell. & Halst., presenta colonias oscuras, setas abundantes, apresorios y esclerocios no descritos, y conidias de 15-21 x 3.5-6.5µm, rectas, cilíndricas a elipsoides. La especie ha sido ubicada como sinónimo de *C. gloeosporioides* específica a *Capsicum* sp.

29) *C. nymphaeae* (Pass.) van der Aa., presenta pigmentaciones rosa pálido a rosado, forma acérvulo, setas ausentes, las y las conidias son elipsoides a cilíndricas, un poco curvadas con dimensiones entre 12-23 x 4-5.5µm.

30) *C. orbiculare* (Berk. & Mont.) von Arx, cuyo telemorfo es *G. lagenarium* Stev., presenta colonias café oscuro a negras, gris oscuro, con margen pálido y pigmentaciones rosadas o crema, puede presentar o no setas y esclerocios, apresorios complejos, las conidias son rectas o un poco curvas, con dimensiones entre 10-15 x 4.5-6µm, y se forman en masas de color rosado salmón. Posee una tasa de crecimiento más baja que *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

31) *C. paludosum* (Ell. & Galw.) von Arx, presenta conidias cilíndricas a elipsoides con dimensiones entre 18-28 x 6-8 µm en cuerpos fructíferos. No se tienen mayores detalles sobre el comportamiento en medios de cultivo.

32) *C. phyllachoroides* (Ell. & Everh.) von Arx, presenta conidias de 18-34 x 4-6.5µm, cilíndricas con puntas obtusas o irregularmente curvas, y el cuerpo fructífero es de color negro brillante.

33) *C. psoraleae* (Peck) von Arx, presenta conidias elipsoides, con dimensiones entre 16-22 x 3.5-5.5µm.

34) *C. spinaciae* Ell. & Halst., produce colonias blancas grisáceas, gris oscuro, setas abundantes, apresorios de color café, clamidosporas intercalares, y conidias fusiformes de 21-28 x 3.5-5.5µm, formadas en masas de color naranja-café.

35) *C. sublineolum* Henn., cuyo telemorfo es *G. cingulata* var. *sorhicola* Sacc., produce colonias con bordes bien delimitados, micelio aéreo gris, setas abundantes, puede presentar esclerocios negros, apresorios abundantes de color café claro, y conidias falcadas, fusiformes que miden entre 18.5-27.5 x 3-4.5µm.

36) *C. trichellum* (Fr.: Fr.) Duke, produce colonias variables, con colores blanco, café-vinaceo, gris, oliva, presentan setas, apresorios de color café, y conidias falcadas, no muy curvas, fusiformes con dimensiones entre 14-24 x 4-6µm.

37) *C. trifolii* Bain & Essary, con colonias de colores desde gris oliváceo, hasta negro oliváceo en el centro con márgenes claras, setas abundantes, esclerocios numerosos e irregulares, apresorios variables en su forma, y conidias formadas en masas de color salmón a melón, rectas, cilíndricas, con dimensiones entre 6-18 x 4-8µm.

38) *C. truncatum* (Schwein.) Andrus & Moore, produce colonias de aspecto algodonoso afelpado con colores en tonalidades grises (gris pálido-gris ratón), salmón, ocre, canela, setas escasas, esclerocios dispersos, apresorios abundantes, y conidias falcadas, fusiformes, con dimensiones entre 12-16 x 4-6µm.

39) *C. typhae* H. C. Greene, presenta colonias con micelio aéreo de color blanco grisáceo, grisáceo-pardeado, de aspecto afelpado, setas dispersas ocasionalmente ausentes, esclerocios negros, apresorios de color café claro, y conidias formadas en masas de color naranja oscuro a rosado salmón, rectas, cilíndricas, algunas veces constrictas en el centro, con dimensiones entre 11.5-21 x 3.5-5µm.

El género *Colletotrichum* y su telemorfo *Glomerella* han sido implicados como agentes causantes de enfermedades conocidas como Antracnosis. El nombre genérico *Glomerella* fue introducido por Von Schrenk y Spaulding (1903), según Sutton (1992). En la revisión sobre el género *Glomerella* y su anamorfo *Colletotrichum*, hecha por Sutton (1992), se reporta que la especie *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spaulding y Schrenk; fue aceptada más tarde como especie lectotipo por von Arx y Müller (1954); el género fue descrito y se asignó a los telemorfos de *Gloeosporium* Auct. y *Colletotrichum* Corda, los cuales habían sido ubicados incorrectamente en *Gnomoniopsis*. Berlese sensu Stoneman (1898).

Glomerella está ubicado por von Arx y Müller (1954) con cinco sinónimos a saber: *Caulochora* Petrak, *Chiloella* Syd., *Haplothecium* Thiess. y Syd., *Hypostegium* Thiess. y *Neozimmermannia* Koorders.

De las 80 especies descritas en el género *Glomerella* cerca de 20 han sido reportadas con anamorfos en *Colletotrichum*. De acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, ocho de los nombres de las especies de *Glomerella* no están validados para publicar (Greuter *et al.*, 1988); 42 nombres han sido ubicados en sinónimos de *Glomerella cingulata* por von Arx y Müller

(1954), quienes adoptaron un concepto amplio de las especies. En *Glomerella cingulata* se conocen más de seis formas especiales.

La especie *Glomerella cingulata* ha sido muy estudiada. C.W. Edgerton fue el primero en señalar en 1914 el carácter heterotálico de este hongo (Alexopoulos, 1962). Sin embargo, Wheeler (1954), citado por Romero (1999) logró demostrar la existencia tanto de cepas homotálicas como heterotálicas.

Actualmente se considera que el sistema sexual de apareamiento de este hongo no encaja simplemente en estas dos categorías; es así como se plantea la existencia de un complejo control genético que involucra la presencia de genes que controlan la generación de tipos de cepas del hongo. Se ha sugerido que la diferencia entre los fenotipos es determinada por un gen simple con alelos que mutan, dicha mutación es controlada por otro gen simple, que puede ser activado o inhibido por factores ambientales. Estudios llevados a cabo han identificado dos genes (A, B), controlando la reproducción de *G. cingulata*. El cambio de hábito peritecial a conidial es determinado por el gen simple A con alelos A+ (para el peritecio) y A' (para la conidia). Este gen controla un interruptor entre el estado conidial y el peritecial. El gen B, con alelos B+ (para cepas que exhiben peritecios dispersos sobre la superficie) y B' (peritecios aglomerados). Este gen controla la distribución de estructuras fructíferas. Existe una alta frecuencia de mutación de B+ a B', la cual es controlada por un gen simple M (Bryson *et al.*, 1992).

Colletotrichum es un género bastante variable, sobre el cual surgen muchas preguntas relacionadas con la taxonomía, evolución, origen de la variación, especificidad hospedera y mecanismos de patogénesis las cuales aún permanecen sin respuestas (Bryson *et al.*, 1992).

En Colombia, Castaño (1978), en su revisión bibliográfica hace la siguiente relación de las primeras especies de *Colletotrichum* registradas como patógenas de plantas, éstas son: *Colletotrichum falcatum* (Anónimo, 1913), causando la enfermedad "Caña mala," que actualmente se conoce como "Pudrición roja de la caña de azúcar" (*Saccharum officinarum*). La especie *Colletotrichum gloeosporioides* reportada por Toro (1927), ocasionando Antracnosis en naranjo dulce (*Citrus sinensis*); Chardón y Toro (1930) la reportaron en flores, cogollos, hojas y frutos de mango (*Mangifera indica*); Orjuela (1938) en anón (*Anona squamosa*); Castaño (1960) en frutos de curuba (*Passiflora mollisima*); Castaño (1964) en aguacate (*Persea americana*), causando manchas foliares y pudrición negra del fruto, y en tomate de árbol tamarillo (*Cyphomandra betacea*) ocasionando Antracnosis en frutos y manchas foliares. Patiño (1968), la reportó en frutos y peciolas de papayo (*Carica papaya*); Castaño (1969) en frutos y ramas de guayabo arrayán (*Psidium* sp); Obregón (1970) en hojas de guanábano (*Anona muricata*). Castaño (1970), reconoció la especie del hongo ocasionando secamiento descendente de las ramas apicales en yuca (*Manihot utilisima*).

Castaño (1978), menciona varios reportes sobre especies de *Colletotrichum* que causan Antracnosis, así: Patiño (1969), *Colletotrichum fragariae*, en peciolas y estolones de fresa (*Fragaria vesca*); Hauzeur (1918), *Colletotrichum gossypii*, en algodón (*Gossypium hirsutum*); Castaño (1960) *Colletotrichum graminicola*, en el tallo y hojas de maíz (*Zea mays*), y en sorgo (*Sorghum vulgare*) causando Antracnosis y mancha roja de la hoja y del tallo; Chardón y Toro (1929-1930), *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol (*Phaseolus vulgaris*); Keissler (1918) *Colletotrichum orchidearum*, causando manchas foliares y pudrición de tallos en orquídeas (*Cattleya* sp.) según Chardon y Toro (1930); Orjuela (1965), *Colletotrichum pisi* en arveja (*Pisum sativum*), causando manchas en hojas y vainas; Toro (1929), *Colletotrichum* sp. en cacao (*Theobroma cacao*) causando Antracnosis y cancrisis; Mejía (1940), en cabuya o fique (*Agave americana*)

causando Antracnosis; Castaño (1951), en café (*Coffea arabica*) causando Antracnosis del fruto y de las ramas.

Pardo (1995), complementa la lista de especies de *Colletotrichum* reportadas como agentes causantes de enfermedades en plantas de importancia económica en Colombia y hace la siguiente relación: *Colletotrichum circinans* (Berk.) Voglino., causando Antracnosis en ajo y cebolla (*Allium* spp); *Colletotrichum crassipes* (Speg.) Arx., causando Pudrición negra en fique o cabuya (*Furcraea* sp.); *Colletotrichum dematium* (Pers.) Grove., causando Antracnosis en capica (*Stylosanthes capitata*); *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., causando Antracnosis en las siguientes plantas: guanábana (*Annona muricata*), anón (*Annona squamosa*), achiote (*Bixa orellana*), papaya (*Carica papaya*), naranja dulce (*Citrus sinensis*), café (*Coffea arabica*), tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*), ñame (*Dioscorea alata*), mango (*Mangifera indica*), yuca (*Manihot utilissima*), curuba de castilla (*Passiflora mollissima*), aguacate (*Persea americana*), guayaba (*Psidium* sp.) y roña del fruto en granadilla (*Passiflora ligularis*).

Colletotrichum fragariae A.N. Br. en peciolo y estolones de fresa (*Fragaria vesca*).

Colletotrichum gossypii South. en algodón (*Gossypium* spp.).

Colletotrichum graminicola (Ces.) Wills. en hojas de sorgo (*Sorghum vulgare*), y en hojas y caña de maíz (*Zea mays*).

Colletotrichum lindemuthianum (S. & M.) Br. & Cv. en hojas, inflorescencias y frutos de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Colletotrichum musae (Berk. & Curtis) Arx, en plátanos y bananos (*Musa* spp.) causando Antracnosis del fruto y punta negra.

Colletotrichum orchidearum Allesch. en hojas de orquídea (*Cattleya* sp.) y ocasionando pudrición del tallo en la orquídea *Epidendrum* sp.

Colletotrichum pisi Pat. en hojas y vainas de arveja (*Pisum sativum*).

Colletotrichum truncatum (Schwwein.) Andrus & Moore. causando Antracnosis en soya (*Glycines max*), y caupí (*Vigna unguiculata*).

También registra otras especies de *Colletotrichum* no identificadas ocasionando las siguientes enfermedades: Antracnosis sobre níspero (*Achras zapota*), remolacha (*Beta vulgaris*), repollo (*Brassica oleracea* var. *Capitata*), frijol canavalia (*Canavalia ensiformis*), papaya (*Carica papaya*), iraca (*Carludovica palmata*), icaco, coco-plum (*Chrysobalanus icaco*), cítricos (*Citrus* spp.), gardenia (*Gardenia* spp), caucho (*Hevea brasiliensis*), pimienta negra (*Piper nigrum*), haba (*Vicia faba*), Antracnosis en ramas de yuca (*Manihot esculenta*), Antracnosis foliar, cancrisis y muerte de mazorcas tiernas en cacao (*Theobroma cacao*), pudrición negra de las hojas de cabuya-fique (*Agave americana*), mancha mantecosa en café (*Coffea arabica*), mancha de hierro de la hoja del cardamomo (*Elettaria cardamomum*), mancha aceitosa del fruto del cardamomo (*Elettaria cardamomum*), mancha foliar en guadua (*Guadua angustifolia*), pudrición del fruto de la macadamia (*Macadamia integrifolia*), añublo foliar en maracuya (*Passiflora edulis*).

Buriticá (1999), recopila y registra en su publicación "Directorio de patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia", las especies de *Colletotrichum* patógenas o asociadas con plantas de interés económico para la agricultura colombiana (Anexo 1).

5.2 ANTECEDENTES SOBRE LA ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL, MORA Y MANZANO EN COLOMBIA

El tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.), la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.), y el manzano (*Malus domestica* Borkh.); son especies que se cultivan en Colombia a alturas comprendidas entre 1200 y 2900 m.s.n.m. en clima frío moderado y frío (Salazar, 1988).

Estas especies de frutales son afectadas por varias enfermedades, entre ellas, la Antracnosis, la cual es considerada una de las enfermedades de mayor importancia económica, no solo por el detrimento que ocasiona a los frutos, sino también por el incremento en los costos de producción y el impacto ambiental que genera su control (Corpoica, 1994).

Como agentes causantes de la Antracnosis en estos cultivos han sido reportados en Colombia los siguientes hongos:

En tomate de árbol, *Colletotrichum gloeosporioides* causando Antracnosis del fruto y mancha foliar, fue reconocido por Castaño (1964, citado por Castaño, 1978); *Gloeosporium* sp. (Girard y Lobo, 1987); *Colletotrichum* sp., posiblemente *C. gloeosporioides* Penz., ocasionando Antracnosis y pudrición de frutos (Girard y Lobo, 1977); *C. gloeosporioides* en frutos en todos los estados de desarrollo, como también en ramas y hojas (Villa, 1996, 1991); *Gloeosporium* spp. y *Colletotrichum* spp. en frutos y hojas (Toro, 1991, 1982; Castillo y Sastoque, 1988); *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk. con anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., sinónimo de *Gloeosporium* Desmaz. & Mont., causando Antracnosis, mancha hundida del fruto y paloteo en los cultivos

ubicados en Antioquia, Caldas, Cesar, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Nariño, Tolima y Valle (Buritica, 1999); *C. gloeosporioides*, en tallos, flores y frutos (Rendón y Afanador, 2001). Afanador *et al.* (2003), y Afanador, Rendón y Hoyos (2000), reportan amplificación del ADN de aislamientos de *Colletotrichum* de tomate de árbol, mediante el uso de un cebador específico para *C. acutatum*. Romero (1999) logró amplificar por PCR el ADN de aislamientos de *Colletotrichum* mediante el uso de un cebador específico para *C. gloeosporioides*, conocido como CglInt y el cebador de secuencia conservada ITS4. Botero (2001), también hace referencia a la presencia de *C. gloeosporioides* en tomate de árbol, identificado mediante técnicas moleculares.

En este cultivo el hongo se reporta atacando casi todos los órganos de la planta (ramas, brotes, hojas, pedúnculos, racimos florales, flores y frutos). En los frutos de cualquier edad los primeros síntomas aparecen entre los 7 y 12 días después de la inoculación, formándose la mancha necrótica alrededor de los 18 días después de la inoculación (Aranzazu y Rondón, 1999; Corpoica, 1999). Según Navarro y Puerta (1978), los primeros síntomas aparecen a los 6 días de la inoculación, y la formación de esporas 5 días después de la aparición de los síntomas iniciales, y la momificación de los frutos ocurre transcurridos 32 días a partir de la inoculación. Estudios realizados por Aranzazu y Chiquito (1998) en Manizales (Caldas), consideran que el periodo de incubación (referido a la aparición del primer síntoma “decoloración y/o presencia de puntos de aspecto aceitoso” en el fruto) dura 5 días en condiciones de laboratorio y 7 en campo; la aparición de la mancha necrótica ocurre entre 9 y 12 días en laboratorio y entre 15 y 20 en condiciones de campo, observándose aparición de acérvulos de color salmón transcurridas 12-18 horas después de conformada la mancha. El ciclo de la enfermedad en el campo es de 25 a 27 días, independiente de la edad del fruto (Rondón, 1999, 1998).

Los frutos mas susceptibles son los denominados “verdes grandes” (frutos entre 19-23 semanas de edad), seguidos de los verdes medianos, siendo los frutos morados y los maduros los estados menos susceptibles (Aranzazu y Chiquito, 1998).

Durante todo el año, las infecciones en los frutos prevalecen en la zona media y en el ápice; con mayor frecuencia en los meses de más altas precipitaciones y humedad relativa. Las infecciones en la zona de inserción del pedúnculo con el fruto, se acentúan en verano (Corpoica, 1999; Aranzazu y Rondón, 1999). La ubicación de estas infecciones en el fruto guarda relación con la acumulación de humedad en el sitio y varían según el comportamiento de la humedad ambiental (Aranzazu, Hincapié y Castillo, 1998; Girard y Lobo, 1987). Según Rondón (1999, 1998), existe una correlación positiva entre los frutos enfermos registrados por época y la precipitación y número de días con lluvia por semana, ocurridos 3 semanas antes, indicando la existencia de un inóculo infectivo en incremento progresivo, lo cual se traduce en altos picos de frutos enfermos colectados tiempo después. No obstante, parece que los excesos de precipitación disminuyen la infección a un mínimo por lavado del inóculo. Aranzazu y Rondón (1999), mencionan que la mayor severidad de la enfermedad ocurre en temporadas lluviosas y días con humedad relativa mayor del 90%.

Las principales fuentes de inóculo se localizan en las hojas, ramas, inflorescencias, brácteas de las flores y frutos (Aranzazu y Rondón, 1999). Corpoica (1999), y Rondón, Páez y Zuluaga (1999) consideran que el follaje es la fuente más importante de inóculo.

El patógeno sobrevive en su estructura reproductiva formando costras que lo protegen de la luz solar y la deshidratación, también sobrevive mediante la formación de apresorios sobre la superficie del hospedante, o como infecciones latentes asintomáticas en los tejidos (Aranzazu y Rondón, 1999). En los frutos es posible observar varias manchas que se unen llegando a cubrir todo o gran parte del fruto, este tipo de síntomas parecen estar relacionados con el transporte y distribución del inóculo por insectos (Aranzazu y Rondón, 1999; Corpoica, 1999; Aranzazu y Chiquito, 1998;). En cuanto a la dinámica del inóculo, estudios realizados por Rondón, Páez y Zuluaga (1999) y Rondón (1998), demuestran que el agua principalmente y en segundo lugar los insectos de los ordenes Díptera, Coleóptero y Homóptera tienen un rol importante en la epidemia; la primera como diseminador de esporas por salpique y arrastre, y los insectos en el transporte de esporas a partir de frutos esporulados que se encuentran en el árbol o en el suelo.

En mora, se reportan como causantes de Antracnosis: *Gloeosporium* sp. (Gómez, 1992); *Colletotrichum gloeosporioides* en tallos y ramas, muy limitante por su incidencia y severidad (Forero de La-Rota, 1993); *Colletotrichum* sp. en ramas basales y laterales en plantaciones de mora del Oriente Antioqueño (Castro et al., 1995); *Colletotrichum gloeosporioides*, causando muerte de tallos y ramas, como también, muerte descendente causada por *Gloeosporium* sp. o *Colletotrichum* sp. (Montoya, Hincapié y Uribe, 1997); *Glomerella cingulata* causando muerte descendente de las ramas (Tamayo, 2001a,b); *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk con anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., sinónimo de *Gloeosporium* Desmaz. & Mont., causando Antracnosis en cultivos de mora ubicados en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Santander y Valle del Cauca (Buritica, 1999).

Avila *et al.* (2003), encontraron en estudios realizados en Granada (Cundinamarca) que en la mayoría de los casos la Antracnosis de la mora ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides*, se presenta sobre los tallos y ramas podadas, en ramas formadas a partir de yemas donde el microorganismo ha permanecido latente y en brotes ubicados en ramas productivas. González *et al.* (2003), en este mismo estudio, encontraron que los factores como la humedad relativa y la precipitación presentan una alta correlación con el avance de la enfermedad, también el tipo de tejido de la planta atacado tiene relación con la severidad y avance de la enfermedad; siendo mayor el avance de la enfermedad en el estrato superior de la planta.

Las investigaciones adelantadas en condiciones de campo por Forero de La-Rotta, Ávila y González (2002), señalan como factores ambientales favorables para el desarrollo de la Antracnosis de la mora, temperaturas alrededor de 16°C, lo cual sugiere según estos mismos investigadores, que el hongo se ha adaptado a esta temperatura; humedad relativa superior a 85% y precipitación semanal acumulada de 22-35mm, son condiciones que favorecen el incremento de las lesiones. Cuando la precipitación es inferior a 19mm por semana no se favorece el desarrollo de la lesión, pues no se presenta agua libre sobre los tejidos, lo cual impide la colonización por el microorganismo.

Botero *et al.* (2002), reportan la Antracnosis causada por *Colletotrichum* sp. como la enfermedad de mayor incidencia (52.9%) en los cultivos de mora ubicados en los departamentos de Caldas, Quindío y Risaralda.

En manzano, el hongo *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld & Schrenk., se reporta causando Pudrición amarga de frutos, Cancrosis del tronco y ramas en

plantaciones ubicadas en Boyacá, (Patiño, 1969 citado por Castaño, 1978; Pardo, 1990). El estado conidial correspondiente a *Colletotrichum gloeosporioides* fue reconocido en plantaciones del departamento de Caldas, causando lesiones en frutos (Salazar, Castaño y Castaño, 1997; Salazar y Castaño, 1996; Salazar, 1995); *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk. con anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., sinónimo de *Gloeosporium* Desmaz. & Mont., está registrado causando Antracnosis en cultivos de manzano ubicados en el departamento de Boyacá (Buritica, 1999). Salazar y Castaño (1996), señalan que los frutos son susceptibles en todos los estados de desarrollo y que el hongo sobrevive en forma de peritecios y acérvulos en frutos momificados y como micelio en madera muerta. También consideran que las conidias y las ascosporas germinan en agua libre, pudiéndose desarrollar la infección en un lapso de 5 horas a 26°C, siendo más rápido el progreso de las lesiones a 30°C.

La importancia de *Colletotrichum* como patógeno a escala mundial y especialmente en regiones tropicales y subtropicales radica en la capacidad que tiene para afectar un amplio número de plantas, causando enfermedades de importancia económica en cereales, hierbas, legumbres, leguminosas de grano y forrajeras, frutales y cultivos perennes; igualmente las frutas tropicales y subtropicales son afectadas por Antracnosis en postcosecha (Latunde-Dada, 2001; Bailey y Jeger, 1992).

Los síntomas de la enfermedad comúnmente conocidos como Antracnosis se observan en los diferentes órganos de las plantas en cualquiera de las etapas de desarrollo, desde semilleros hasta plantas adultas y semillas. Las pérdidas son causadas por los efectos de la enfermedad en las etapas de crecimiento vegetativo en donde ocurre pérdida de áreas fotosintéticas, mal funcionamiento

fisiológico, caída de flores, frutos y pérdidas en poscosecha debidas a las infecciones latentes (Bailey y Jeger, 1992).

Según Mills, Hodson y Brown (1992), el género *Colletotrichum* contiene una amplia colección, extremadamente diversa de hongos que incluyen saprofitos y patógenos. Von Arx (1957), Mordeu (1971), Sutton (1980) y Simmonds (1965), citados por Mills, Hodson y Brown (1992), reportan amplia variabilidad de las especies de *Colletotrichum*.

El conocimiento sobre cuál es la especie predominante en una plantación es importante, considerando que las especies de *Colletotrichum* pueden diferir en la sensibilidad a los fungicidas (Schilder, 2003).

Los criterios moleculares y bioquímicos son considerados una base para entender la taxonomía de *Colletotrichum*, estas técnicas modernas son una herramienta para el análisis y complemento de los métodos taxonómicos tradicionales (Bailey y Jeger, 1992).

5.3 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN EN EL GÉNERO *Colletotrichum*

La identificación de las especies dentro del género *Colletotrichum* se ha basado en caracteres morfológicos y culturales, tales como: tamaño y forma de conidias, presencia de setas, esclerocios, forma del apresorio (Martínez-Culebras *et al.*, 2000; Bailey y Jeger, 1992), crecimiento en medios de cultivo, tasa de crecimiento, forma y aspecto de la colonia, color de la colonia y la esporulación (Freeman,

Katan y Shabi, 1998; Gil *et al.*, 1994; Gil, 1992; Sutton, 1992). También se ha basado en otras características como: sensibilidad a benomil, temperatura óptima de crecimiento, existencia del telemorfo, especificidad de hospedantes, y estudios de compatibilidad vegetativa (VCG) (Freeman, Katan y Shabi, 1998). *Colletotrichum* contiene una amplia y diversa colección de hongos que incluyen saprofitos y patógenos, que se caracterizan por poseer gran variabilidad (Mills, Hodson y Brown, 1992).

Freeman, Katan y Shabi (1998), realizaron estudios para diferenciar especies de *Colletotrichum* de Israel y California, Estados Unidos, responsables de Antracnosis en almendro, aguacate y fresa; para el efecto emplearon métodos tradicionales que incluyeron aspectos morfológicos (tamaño y forma de las conidias, forma y color de la colonia) y otros caracteres (tasa de crecimiento, sensibilidad a benomil, determinación de grupo de compatibilidad vegetativa VCG), complementados con estudios moleculares. Las técnicas más exitosamente empleadas para complementar trabajos de caracterización han sido: Análisis de ADN ribosomal (rDNA): polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP), análisis de A+T-rich ADN asociado con ADN mitocondrial y (ap-PCR) ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD).

Respecto a los caracteres morfológicos, Freeman, Katan y Shabi (1998) encontraron, por ejemplo, que en la especie *C. acutatum* las conidias son elípticas fusiformes, mientras que las de *C. gloeosporioides* son oblongas con extremos obtusos; sin embargo, este criterio además del tamaño de las conidias no es consistente para distinguir las especies. En relación con estas dos especies Adaskaveg y Hartin (1997), encontraron para *C. gloeosporioides*, conidias cilíndricas con extremos redondeados, presencia de setas, presencia del estado telemorfo, colonias gris oscuro, tasa de crecimiento entre 13-14 mm/día; y para *C.*

acutatum, conidias fusiformes, raramente con producción de setas, carece de telemorfo, colonias gris claro, tasa de crecimiento entre 8 y 9 mm/día. Aunque Wharton y Diéguez (2004), registran que *C. acutatum* produce el telemorfo en medios de cultivo artificiales.

Con relación a la tasa de crecimiento se ha reportado que los aislamientos de *C. acutatum* crecen mas lentamente que los aislamientos de *C. gloeosporioides*; sin embargo, Freeman, Katan y Shabi (1998), encontraron aislamientos de *C. gloeosporioides* (procedentes de almendro en Israel) con crecimiento lento que no difirió significativamente de la tasa de crecimiento de aislamientos de *C. acutatum* procedentes de fresa.

En cuanto a la forma, aspecto y color de la colonia, estos caracteres pueden variar considerablemente dentro y entre las especies (Freeman, Katan y Shabi, 1998). La mayoría de los aislamientos de *C. acutatum* (procedentes de almendro de California) presentaron pigmentaciones salmón; mientras que los de *C. gloeosporioides* (procedentes de almendro en Israel) variaron de blanco a gris oscuro. Sin embargo, numerosos patrones morfológicos han sido observados en poblaciones de *C. gloeosporioides* procedentes de aguacates de Israel, los cuales presentaron aislamientos en los que predominaron conidias en masas, sin micelio aéreo; aislamientos con micelio raso con pocas conidias; aislamientos con micelio aéreo denso y masas de conidias; aislamientos con micelio aéreo denso (tipo micelial); tipo protoperitecial, micelio aéreo denso con masas de conidias y agregados hifales oscuros parecidos a un protoperitecio; y aislamientos tipo peritecial, con peritecio simple o complejo (Freeman, Katan y Shabi, 1998).

La estabilidad de los rasgos morfológicos es afectada por factores ambientales, además de la existencia de formas intermedias en la morfología conidial, tamaño, variación en los caracteres de las colonias; ésto conlleva a que la cepa pueda ser identificada como una u otra especie dependiendo de los criterios individuales del identificador (Freeman, Katan y Shabi, 1998; Sutton, 1992). La presunta existencia de formas intermedias entre las especies, la plasticidad morfológica y la superposición fenotípica, hacen difícil la clasificación y complicado el empleo del criterio clásico para la identificación de las especies de éstos patógenos (Martínez-Culebras *et al.*, 2000); lo cual es crítico para el mejoramiento de la resistencia, y el manejo de la enfermedad (Freeman, Katan y Shabi, 1998).

Las especies de *Colletotrichum* pueden crecer en medios de cultivo artificiales de tal forma que este otro factor, adicionado a los criterios disponibles de sistemática para diferenciar especies del hongo ha incrementado las dificultades, pues raras veces existe estandarización de los protocolos y condiciones de trabajo entre diferentes investigadores; además de que no existen convenciones internacionalmente aceptadas. Todo lo anterior combinado con la plasticidad inherente a los aislamientos ha generado controversias y confusiones frecuentes que conducen a incertidumbre en las identificaciones (Sutton, 1992).

La sensibilidad a benomil ha sido usada como método adicional para caracterización de poblaciones locales de *Colletotrichum* asociadas con Antracnosis. En general se ha considerado que los aislamientos de *C. gloeosporioides* son muy sensibles a benomil; mientras que los de *C. acutatum* son relativamente insensibles. Sin embargo, en los estudios realizados por Freeman, Katan y Shabi, (1998), para diferenciación de especies de *Colletotrichum* responsables de Antracnosis en almendro, aguacate y fresa en Israel, se encontró que *C. gloeosporioides* procedente de aguacate y almendro

diferían en la sensibilidad a benomil. Los aislamientos procedentes de aguacate fueron completamente insensibles y los de almendro solo mostraron una inhibición del 50% en su crecimiento.

En Colombia, Aranzazu, Álvarez y Zuluaga (1998), encontraron al cabo de 8 meses de evaluación de productos y tratamientos para el control de la Antracnosis del tomate de árbol causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, que el tratamiento a base de benomil fue el más ineficiente, con un 94.5% de frutos infectados por el hongo después de 22 aplicaciones; el tratamiento testigo con una sola remoción semanal de frutos enfermos, presentó un 94% de frutos infectados.

La temperatura óptima de crecimiento es otro criterio usado para separar aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*; la temperatura óptima de crecimiento de *C. acutatum* es de 25°C., y la *C. gloeosporioides* 30°C. (Wharton y Diéguez, 2004).

Los estudios de compatibilidad somática o compatibilidad vegetativa (VCG), se usan para determinar interacciones de aislamientos dentro y entre poblaciones; sin embargo, el método VCG no se puede usar para clasificación taxonómica de especies de *Colletotrichum*, pero puede ser útil para delimitar subpoblaciones entre especies que se reproduzcan asexualmente (Freeman, Katan y Shabi, 1998).

La compatibilidad somática se manifiesta en la afinidad o repelencia que se presenta cuando se enfrentan uno o más aislamientos entre sí. En Colombia, estudios llevados a cabo por Romero (1999) con la especie *C. gloeosporioides*

procedente de tomate de árbol de diferentes departamentos, no permitieron establecer diferencias entre los aislamientos; en el estudio se encontró que los aislamientos evaluados tienen un mismo origen vegetativo, existiendo compatibilidad representada en anastomosis hifal entre los aislamientos.

Colletotrichum, es un género que incluye saprofitos y patógenos. Los patógenos de plantas se han nombrado teniendo en cuenta la planta hospedante de la cual son aislados (Mills, Hodson y Brown, 1992). La especificidad del hospedante y la patogenicidad de las especies, también han servido de base para la taxonomía (Sutton, 1992; Gil, 1992). Sin embargo, los sistemas de identificación que se basan solamente en la consideración de la planta hospedante, no son satisfactorios, por revelar poca relación entre las especies de hongos (Mills, Hodson y Brown, 1992).

La diferenciación de las especies de *Colletotrichum* basada en el rango y origen del hospedante, puede no ser confiable, dado que la taxa que incluye a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum graminicola* afecta un amplio rango de hospedantes. En otras ocasiones opuestas a lo anterior algunas taxas están restringidas a familias de plantas, géneros o especies; o aún a variedades (Freeman, Katan y Shabi, 1998). Lourd, Geiger y Goujon (1979), encontraron que varias cepas morfológicamente diferentes podían ser aisladas de una misma planta, y que el hospedante no aporta en la mayoría de los casos indicaciones precisas sobre la identidad de especies de *Colletotrichum*; como tampoco el origen geográfico de las cepas o aislamientos.

Estudios llevados a cabo por Gil *et al.* (1994), en *Phaseolus vulgaris* de Malawi demostraron la presencia de diferentes especies de *Colletotrichum* sobre el mismo hospedante (*C. gloeosporioides* proveniente de la vaina 1 y *C. lindemuthianum* de la vaina 5 del mismo hospedante y país); también se encontraron diferencias entre los aislamientos de las diferentes vainas y tejidos de la vaina.

La agresividad y la especificidad de algunas de las especies o subespecies del género *Colletotrichum*, hacia especies de plantas en particular, ha llevado a emplear cepas del hongo como micoherbicidas para el manejo de malas hierbas en cultivos comerciales; entre estas han sido patentadas y se comercializan: Coello (*Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene*), para el manejo de *Aeschynomene virginica* en cultivos de soya y arroz en Arkansas, Estados Unidos; Biomal (*C. gloeosporioides* f. sp. *Malvae*) en el manejo de *Malva pusilla* en los cultivos de lenteja y trigo de Canadá; Burr anthracnose (*C. orbiculare*) para el manejo de *Xanthium spinosum* en cultivos de forrajes en Australia; Velgo (*C. coccodes* cepa Daom 183088) para el manejo de *Abutilon theophrasti* Medik en cultivos de maíz y soya de Norte América (García, 2001).

En otros casos, múltiples especies de *Colletotrichum* están asociadas con un solo hospedante; como sucede en las Antracnosis de las frutas del aguacate y del mango ocasionadas tanto por *Colletotrichum gloeosporioides* como por *Colletotrichum acutatum*. Similarmente la fresa puede ser infectada por tres especies de *Colletotrichum* a saber: *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides*, las cuales causan Antracnosis en frutos y otras partes de la planta. Ejemplos adicionales de hospedantes afectados por múltiples especies de *Colletotrichum* incluyen café, cucurbitáceas, pimienta y tomates (Freeman, Katan y Shabi, 1998).

También se han reportado casos en los cuales especies únicas de *Colletotrichum* afectan múltiples hospedantes, por ejemplo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. in Penz. (telemorfo, *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld & Il. Schrent.), la cual es considerada un conglomerado de especies y formas del estado sexual, que se pueden encontrar sobre una amplia variedad de frutas que incluyen almendras, aguacates, manzanas y fresas. Igualmente sucede con *C. acutatum* J.H. Simmonds, que afecta un gran número de frutales incluyendo aguacate, fresa, almendras, manzana y durazno (Freeman, Katan y Shabi, 1998). El hongo *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. in Penz., es una especie genéticamente variable, que comprende un número de formas especializadas con relación al hospedante, capaces de causar enfermedad sobre un amplio rango de hospedantes, o ser específicas a un hospedante. La caracterización de aislamientos específicos a un hospedante es difícil, y aún es crítica la diferenciación de aislamientos procedentes de diferentes hospedantes (Kaufmann y Weidemann, 1996).

Otras especies con amplio rango de hospedantes son: *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum capsici* y *Colletotrichum dematium* (Freeman, Katan y Shabi, 1998). Con relación a la especificidad del hospedante, existen numerosos informes sobre potenciales infecciones cruzadas entre diferentes especies de *Colletotrichum* sobre múltiples hospedantes; pero los estudios en su mayoría han sido realizados sobre órganos desprendidos de la planta (hojas, frutos) en los cuales se han hecho inoculaciones artificiales bajo condiciones controladas en laboratorio, presentándose la infección dependiendo de la densidad de inóculo; por lo que no se garantiza que la infección se presente bajo condiciones de campo (Freeman, Katan y Shabi, 1998).

Estudios llevados a cabo por Freeman y Shabi (1996), con las especies *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y *C. acutatum* J. H. Simmonds., agentes causantes de Antracnosis en frutas tropicales y subtropicales, permitieron determinar la existencia de infecciones cruzadas potenciales en frutos cosechados de almendro, manzano, aguacate, mango y nectarino inoculados artificial y superficialmente. Todos los frutos mostraron síntomas típicos de Antracnosis cuando se inocularon con varios aislamientos de *C. gloeosporioides* (obtenidos de aguacate, manzana, almendro, mango) y *C. acutatum* (obtenidos de manzana y durazno). Sin embargo, los dos aislamientos de *C. gloeosporioides* que procedían de almendro crecieron más lentamente, produciendo lesiones significativamente de menor tamaño en todos los frutos inoculados incluyendo el almendro hospedante original. No se observaron diferencias significativas en el tamaño de las lesiones de los frutos de manzano y durazno inoculados con aislamientos de *C. acutatum* (Freeman y Shabi, 1996); sin embargo, la infección natural cruzada en el campo debe ser experimentada. Se debe observar que los procedimientos de inoculación artificial que se llevan a cabo en frutos cosechados se usan rutinariamente para determinar la especificidad del hospedante y la patogenicidad del *Colletotrichum* spp. (Freeman y Shabi, 1996).

En Colombia, trabajos desarrollados por Puerta e Isaza (1992, 1983, 1982), en los que se inocularon frutos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.), con aislamientos de *Colletotrichum* procedentes de vainas de frijol ICA Viboral (*Phaseolus vulgaris* L.), frutos de papaya (*Carica papaya* L.), lulo (*Solanum quitoense* L.) y pecíolos de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) presentaron diferentes respuestas en cuanto a patogenicidad y severidad de los aislamientos a saber: los aislamientos de *C. lindemuthianum* de frijol y *Colletotrichum* sp. de granadilla no resultaron patogénicos a tomate de árbol, *Colletotrichum* sp. de lulo y *C. gloeosporioides* de papaya produjeron lesiones sobre tomate de árbol, sin llegar

a ser muy virulentos; y *Colletotrichum* aislado de pecíolos de granadilla ejerció antagonismo total sobre el *C. gloeosporioides* del tomate de árbol.

Tamayo (1984), encontró diferencias en cuanto a características culturales (crecimiento radial y producción de conidias) y de patogenicidad cuando se inocularon frutos desprendidos de tomate de árbol rojo (variedad local o ecotipo rojo) con aislamientos de *C. gloeosporioides* de tipo conidial (aislamientos de color salmón, obtenidos de frutos de tomate rojo) y tipo micelial (aislamientos de apariencia blanco grisáceo, obtenidos de la variedad local o ecotipo de frutos amarillos). El aislamiento micelial creció mas rápidamente que el conidial en medio de cultivo PDA y PDA acidificado; y la producción de conidias después de 9 días fue mayor con el aislamiento conidial. En cuanto a la patogenicidad, los frutos rojos, inoculados con el aislamiento conidial desarrollaron lesiones de mayor tamaño respecto a las producidas por el aislamiento micelial. Considerando el hecho de que dos aislamientos de *C. gloeosporioides* presentaran diferencias culturales y patogénicas, se sugiere la existencia de razas del hongo en tomate de árbol. Corpoica (1999), registra que los tres materiales de tomate de árbol (rojo común, tamarillo y amarillo), presentan una reacción diferente a cada cepa o aislamiento del hongo; y cada material en particular responde también de manera diferente a todos los aislamientos. Dodd *et al.* (1991, citados por Botero, 2001) consideran que las diferencias en la patogenicidad de una cepa pueden ser consecuencia de las interacciones del medio ambiente, la secreción de enzimas del hongo y el genotipo del hospedante.

Dado que los métodos “tradicionales” han sido poco satisfactorios para la diferenciación entre especies y subespecies de *Colletotrichum*, las investigaciones moleculares han ganado popularidad; es así como algunas técnicas moleculares se están empleando para diferenciar poblaciones de *Colletotrichum* provenientes

de varios hospedantes. Las técnicas más exitosamente empleadas para complementar trabajos de caracterización han sido: Análisis de ADN ribosomal (rDNA); polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), análisis de A+T-rich ADN asociado con ADN mitocondrial y ap-PCR, ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD). Estas técnicas se han usado para diferenciar las poblaciones de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. coccodes*, *C. kahawae*, *C. magna* y *C. orbiculare*. Adicionalmente se ha logrado demostrar la complejidad genética de los aislamientos de *Colletotrichum* que infectan frutas tropicales (Freeman, Katan y Shabi, 1998).

Para la diferenciación de especies de *Colletotrichum*, Mills *et al.* (1994, citados por Adaskaveg y Hartin, 1997), determinaron la secuencia de nucleótidos de la región ITS1 de varias especies de *Colletotrichum*. Basados en esta información desarrollaron cebadores que se usaron con el cebador conservado ITS4. Estos cebadores fueron útiles para la identificación de *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. kahawae*; Sin embargo, el cebador desarrollado y probado para *C. acutatum*, no permitió diferenciar aislamientos de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, y *C. fragariae* cuando éstos procedían de fresa.

Posteriormente en los estudios llevados a cabo por Adaskaveg y Hartin (1997), para diferenciar especies de *Colletotrichum* aisladas de almendro, fresa, durazno, manzana, cítricos y papaya procedentes de diferentes zonas (Merced C.A., Butte C.A., Stanislaus C.A., California, Yolo C.A., Yuba C.A., Carolina del sur y Hawai) se sintetizaron los siguientes cebadores específicos así: para *C. gloeosporioides* el cebador CgInt (⁵GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG³); para *C. acutatum* los cebadores: CaInt-1(⁵GGCGCCGGCCCCACCGGGGA³) y CaInt-2 (⁵GGCGCCGGCCCCGTCACGGGGG³); también, para *C. fragariae* se sintetizó el cebador Cflnt (⁵GGCCTCCCGCCCCCGGCGG³). Por PCR se obtuvieron

productos de ADN con los cebadores CgInt - ITS4 y Calnt 2 - ITS4. En este estudio los cebadores CgInt - ITS4 solo amplificaron para los aislamientos de cítricos y papaya (representativos para *C. gloeosporioides*), pero cuando se usaron CfInt - ITS4 solo amplificaron los aislamientos de papaya pero no los de cítricos. Importa tener en cuenta que los cebadores CgInt y CfInt, solamente difieren en tres pares de bases y así las diferencias entre aislamientos de *C. gloeosporioides* pudieron ser detectadas con el uso de estos cebadores. Sreenivasaprasad *et al.* (1993, citados por Adaskaveg y Hartin, 1997) realizaron estudios de RFLP, análisis de ADN ribosomal, ADN mitocondrial, y análisis de secuencias. Estos investigadores sugieren que debido a la semejanza de *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. kahawae*, estas no deben considerarse como especies separadas.

Los autores de este estudio, Adaskaveg y Hartin (1997), también presentan en una tabla y en una figura los resultados obtenidos con los cebadores; en ellas se observa que los dos cebadores construidos para *C. acutatum* amplificaron para los aislamientos de fresa, almendro y durazno.

Brown, Sreenivasaprasad y Timmer (1996), mediante la secuenciación de nucleótidos de la región ITS1 del ADN ribosomal (rDNA) del hongo lograron diferenciar las especies de *Colletotrichum* aisladas de fresa e identificar *C. acutatum*, mediante la aplicación de técnicas empleadas en la identificación de las especies de *Colletotrichum* de cítricos. El cebador específico para *C. acutatum* Calnt2 (5'GGGGAAGCCTCTCGCGG³), de la región ITS1 de *C. acutatum* en conjunto con el cebador ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC³) proveniente de la región conservada del gen 25/28S del ADN ribosomal, amplificaron fragmentos de 490pb de ADN genómico de aislamientos de *C. acutatum*; mientras que con el cebador CgInt (5'GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG³) de la región ITS1 de *C.*

gloeosporioides y el cebador ITS4 se amplifican fragmentos de 450pb de ADN genómico (Brown, Sreenivasaprasad y Timmer, 1996). Es de resaltar que en la Antracnosis de los cítricos se presentan conidias atípicas de *C. acutatum* que se han confundido en su morfología con las de *C. gloeosporioides*, lo cual ha causado dificultades en la identificación. Agostini *et al.* (1992, citados por Brown, Sreenivasaprasad y Timmer, 1996), mencionan la aplicación práctica de éstos cebadores para solucionar el problema y confirmar la especie.

Freemam, Katan y Shabi (1998), mediante cebadores específicos diseñados de acuerdo a diferencias en la secuencia de oligonucleótidos de la región ITS de aislamientos representativos de varias especies de *Colletotrichum* responsables de Antracnosis en un amplio rango de hospedantes en Israel y California, Estados Unidos, lograron diferenciar *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, encontrando que un fragmento de 490pb amplificado por PCR estuvo presente en los aislamientos de *C. acutatum* cuando se usaron los juegos de cebadores Calnt2 e ITS4; mientras, que en los aislamientos de *C. gloeosporioides* se amplificaron fragmentos de 450pb con los cebadores CgInt e ITS4. Estos investigadores registran que al usar cebadores específicos para *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*, las dos especies son similares entre si, pero se pueden distinguir de *C. acutatum*. Con este método fue posible distinguir aislamientos de *C. acutatum* (procedentes de almendro, manzano, durazno y fresa) de aislamientos de *C. gloeosporioides* de papaya y cítricos. Estos trabajos demuestran que el análisis del ADN ribosomal es adecuado como herramienta taxonómica para la identificación de especies y para el diagnóstico de patógenos en plantas, pero no para diferenciar subpoblaciones dentro de especies (Freeman, Katan y Shabi, 1998).

Las regiones de transcripción interna (ITS) no codificadoras y variables y la región del gen 5.8S del rRNA codificadora y conservada, son útiles para medir las

relaciones filogenéticas dentro del hongo debido a que las regiones ribosomales evolucionan de una forma tal que presentan bajo polimorfismo intraespecífico y alta variabilidad interespecífica; lo cual ha sido muy útil para la identificación de especies de *Colletotrichum*. La región 5.8S-ITS ha sido amplificada por PCR usando los cebadores universales ITS1:(GCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (GCCTCCGCTTATTGATATGC) (Martinez-Culebras *et al.*, 2000).

Estudios realizados en Colombia por Romero (1999), con aislamientos de *C. gloeosporioides* obtenidos de tomate de árbol (procedentes de huertos establecidos en Cundinamarca, Quindío, Santander, Cauca y Antioquia) determinaron la existencia de variabilidad en la tasa de crecimiento, morfología y tamaño de conidias, color de las colonias y patogenicidad de los aislamientos. Igualmente mediante la técnica RAPDs, y el análisis de polimorfismo se demostró la existencia de diversidad genética del patógeno.

El uso de un tipo particular de ADN no siempre garantiza información suficiente. En algunos casos los análisis de mtADN o rADN pueden dar estimaciones de diversidad específica y subespecífica; pero en otros casos puede ser imposible distinguir las especies usando un solo tipo de ADN. No obstante parece que el ADN total tiene el mayor potencial para detectar los cambios en genotipos que pueden llevar a la diferenciación de patotipos (Mills, Hodson y Brown, 1992).

Diversos métodos genéticos y moleculares se han empleado para la diferenciación de aislamientos patogénicos de *C. gloeosporioides* de diferentes hospedantes, entre éstos: la electroforesis de proteínas solubles totales para la caracterización de aislamientos de *C. gloeosporioides* y para la estimación de interrelaciones genéticas dentro y entre los grupos de aislamientos, la electroforesis de

isoenzimas para evaluar diversidad genética en hongos, y como herramienta útil para diferenciar la variabilidad intraespecífica en *C. gloeosporioides* aislado de diversos hospedantes; esta última técnica ha sido usada por micólogos y patólogos para evaluar la cantidad de variación genética dentro y entre poblaciones de hongos, también para localizar el origen geográfico de patógenos y para determinar los niveles de poliploidia en hongos (Kaufmann y Weidemann, 1996).

La electroforesis de isoenzimas y análisis de sitios de restricción son técnicas aplicables a la mayoría de los estudios de variación intraespecífica. El secuenciamiento de ADN también es aplicable a este nivel, pero muchos de los estudios de variación intraespecífica requieren examinar un gran número de individuos, sobre un gran número de loci; lo cual es costoso y demorado. Por esto para la mayoría de los estudios a nivel intraespecífico, la electroforesis de isoenzimas y el análisis de sitios de restricción permanecen como herramientas usuales, aunque el secuenciamiento de ADN puede ser necesario para resolver ciertos problemas particulares. La variación geográfica que pueden tener las especies, la detección de la diversidad clonal en especies unisexuales, el origen de las especies, y el descubrimiento de las especies enigmáticas, pueden ser estudiados con electroforesis de isoenzimas y análisis de sitios de restricción (Hillis y Moritz, 1996).

Estudios de caracterización de *Colletotrichum* por lectinas, y por anticuerpos monoclonales también han permitido establecer y reconocer grupos de aislamientos del hongo (Gil *et al.*, 1994).

Respecto a la selección de la técnica a emplear se debe tener presente que ciertas técnicas son mejores que otras para responder a problemas particulares; pero ninguna es la mejor en todas las circunstancias, solo combinando datos de varias técnicas moleculares con datos morfológicos es posible obtener un resultado comprensible (Hillis y Moritz, 1996).

La escogencia de la técnica dependerá de la resolución requerida para tratar el problema de interés. Varias técnicas pueden ser apropiadas para tratar un problema en particular; sin embargo, el costo y la disponibilidad de la tecnología son factores muy importantes a considerar (Hillis y Moritz, 1996).

La tendencia actual es disminuir el número de taxas existentes y explotar los criterios bioquímicos y de biología molecular para entender la taxonomía de *Colletotrichum* (García, 2001).

5.4 ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL GÉNERO *Colletotrichum*

Colletotrichum es un hongo con 39 especies aceptadas en el género, las cuales continúan en revisión para aclarar su taxonomía mediante técnicas moleculares. Dicho hongo pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, clase Deuteromycetes, subclase Coelomycetidae, orden Melanconiales y familia Melanconiaceae. Algunas especies de *Colletotrichum* son el anamorfo de *Glomerella*. Los síntomas del ataque del hongo se conocen con el nombre de Antracnosis (Latunde-Dada, 2001); aunque Romero (1999), y Waller (1992) mencionan que el hongo también da origen a otras patologías conocidas como moteados, tizones, pudriciones, muerte descendente y manchas foliares.

El nombre de Antracnosis proviene del Griego "carbunco, enfermedad" y corresponde a un nombre genérico con que se designan las enfermedades producidas por ciertos hongos del orden Melanconiales (de los géneros *Gloeosporium* y *Colletotrichum*) que se manifiestan por manchas pardas deprimidas y con frecuencia aureoladas que terminan por ulcerarse (Font Quer, 1985). Castaño-Zapata (1994) define como Antracnosis a una enfermedad que se manifiesta con lesiones deprimidas de color oscuro sobre hojas, tallos o frutos, y que es causada por hongos que producen sus esporas en un acérvulo; característica de los hongos del orden Melanconiales.

Las diferentes especies de *Colletotrichum* presentan una alta efectividad en las infecciones y pueden causar daños en todas las partes de la planta, raíces, tallos, brotes tiernos, hojas, flores y frutos, y pueden presentar preferencia por algunos tejidos en particular (García, 2001; Adaskaveg y Hartin, 1997; Bailey *et al.*, 1992).

La enfermedad producida por las diferentes especies del género *Colletotrichum* se puede manifestar por la aparición de manchas oscuras de tamaño variable y formas redondeadas u ovaladas. Estas lesiones en algunas ocasiones se presentan ligeramente hundidas o hendidas, con bordes ligeramente salientes. En los centros de las lesiones, comúnmente se observan masas de esporas de color rosa, o muy cercano al color rojo; las esporas se localizan en acérvulos que se distribuyen en formaciones concéntricas simulando anillos bien diferenciados; estas agrupaciones de cuerpos fructíferos son muy notorias en las épocas de alta humedad y constituyen la principal fuente de inóculo del hongo (García, 2001). En la lesión, el acérvulo subepidermal presenta forma de disco o cojín ceroso con diámetro de 300µm, estos cuerpos presentan espinas o setas oscuras que miden entre 4 y 9µm de diámetro y menos de 100µm de largo, ubicadas en el borde del acérvulo o en medio de los conidióforos; dichas setas no siempre se encuentran

presentes. Los conidióforos del hongo son simples, elongados; las conidias son hialinas, unicelulares, ovoides u oblongas con medidas entre 11-20 x 2.5- 5.5 μ m, y poseen una vacuola cerca del centro (Botero, 2001; Bailey y Jeger, 1992; Barnett, 1960). En los acérvulos las conidias ocasionalmente pueden ser encorvadas (Agrios, 1991).

El hongo crece fácilmente en medio papa dextrosa agar (PDA) produciendo una colonia de aspecto cremoso, color salmón con micelio blanco en los bordes, el cual se torna grisáceo con el transcurso del tiempo. El desarrollo completo se logra a los 15 días con temperatura de 25°C (Bailey y Jeger, 1992, citados por Botero, 2001).

Las conidias de *Colletotrichum* se encuentran recubiertas por una matriz compleja, compuesta por un material húmedo y mucilaginoso que contiene polisacáridos, glicoproteínas, enzimas y materiales autoinhibidores de la germinación, los cuales hacen que no ocurra germinación prematura de conidias durante el tiempo que éstas permanecen en los acérvulos y peritecios. La matriz actúa además, como protector de las conidias contra la desecación, los efectos nocivos de la luz ultravioleta y los metabolitos tóxicos biosintetizados por las plantas (García, 2001; Bailey *et al.*, 1992).

El inóculo inicial procede de infecciones latentes existentes en órganos vegetales donde se encuentran pequeñas cantidades de inóculo del tipo virulento, entre otras muchas infecciones latentes del tipo no virulento (Whiteside, Garnsey y Timmer, 1996). El proceso infectivo del hongo se favorece con la lluvia, la alta humedad ambiental y una temperatura de 20 -25°C. La esporulación requiere alta humedad y la liberación y dispersión de las conidias dependen del agua libre. Las

esporas germinan en presencia de agua, producen un apresorio con una pared gruesa y melanizada que se adhiere a la superficie del hospedante hasta penetrar la cutícula y la pared celular del hospedante por medio de las hifas de infección con la ayuda de enzimas cutinasas y celulasas (Waller, 1992).

Según Bailey *et al.* (1992), es posible la penetración del hongo a través de aberturas naturales, como los estomas. También puede ocurrir a través de heridas (Perez, 1993); aunque, Bailey *et al.* (1992), registran que las heridas no siempre facilitan o son esenciales para la infección. Una de las formas más comunes es la penetración directa de la barrera cuticular mediante fuerza mecánica sola o con ayuda de cutinasas (involucradas en la penetración inicial, e inhibidas posteriormente); aunque, para algunas especies de *Colletotrichum* la actividad de la cutinasa se requiere para la penetración; para otras especies parece ser suficiente la fuerza mecánica. El mecanismo de penetración de la cutícula aún permanece sin esclarecerse completamente (Bailey *et al.*, 1992).

Después del hongo haber penetrado en los tejidos del hospedante, las hifas crecen rápidamente tanto intercelular como intracelularmente, produciendo poca o ninguna decoloración visible u otros síntomas de alteración en el tejido, presentándose considerable variación en el comportamiento de las plantas infectadas por el hongo, así como en las especies del hongo, e incluso puede haber varias razas con un grado de patogenicidad distinto dentro de cada una de las especies del hongo (Agrios, 1991). Esta fase en la cual el hongo se establece en el hospedante invadiendo sus células sin causarles la muerte se conoce con el nombre de hemibiotrófica, y las especies del hongo que presentan este comportamiento se denominan patógenos intracelulares hemibiotróficos. Existen otras especies de *Colletotrichum* que después de penetrar la cutícula crecen por debajo de las paredes de la epidermis de las células del hospedante y disuelven la

matriz péctica que las forma, pero no penetran al interior de las células, estas especies que tienen este comportamiento se conocen como patógenos subcuticulares intramurales (García 2001; Bailey *et al.*, 1992).

Una vez colonizados los tejidos de la planta por el hongo, el crecimiento del patógeno cambia a una fase necrotrófica, responsable de la Antracnosis y los síntomas típicos de las enfermedades causadas por la especie de *Colletotrichum*. Durante la fase necrotrófica el hongo crece extensivamente dentro de las células, en las paredes y en los espacios intracelulares, destruyendo los tejidos; sin embargo, las cutículas de los tejidos afectados se mantienen intactas sugiriendo la inhibición de enzimas cutinasas; la cutícula parece jugar un papel todavía no definido en la reproducción de *Colletotrichum*. La formación del acérvulo y el peritecio parece requerir una cutícula intacta (Bailey *et al.*, 1992). En condiciones apropiadas las hifas del hongo ubicadas en la subcutícula producen los acérvulos de donde se dispersan las conidias por acción de la lluvia (Whiteside, Gamsey y Timmer, 1996).

En las especies de éste género se observa frecuentemente un estado de relación parasitoide no activa con el hospedante, denominada enfermedad quiescente o latente (García, 2001). La variabilidad en el periodo de latencia del patógeno representa una adaptación muy importante a las condiciones de la fisiología del tejido y a los patrones climáticos que ocurren durante el ciclo de los cultivos; de tal forma que los niveles de la enfermedad crecen aceleradamente durante los periodos susceptibles del cultivo que coinciden con las condiciones ambientales apropiadas (Forero de La-Rotta, Ávila y González, 2002).

La quiescencia puede ocurrir como una estructura de hifa subcuticular, cuyo crecimiento es inhibido dentro del tejido del hospedante. El mecanismo de la quiescencia de *Colletotrichum* puede variar, dependiendo de la relación hospedante-patógeno, e incluye cambios posinfección más que características preinfección (Prusky y Plumbley, 1992). Los efectos de la quiescencia son muy marcados en los frutos; durante el estado de letargo del hongo no se observa ningún síntoma que muestre la presencia de la enfermedad. Este estado puede durar largo tiempo, usualmente todo el requerido por el fruto para su desarrollo, posteriormente el hongo cambia a un estado muy activo cuando el fruto inicia la maduración (García, 2001). Se ha planteado que los compuestos presentes en las epidermis de los frutos inhiben el desarrollo adecuado de las esporas del hongo por un período de tiempo prolongado. Los cambios metabólicos asociados con el proceso de maduración rompen el letargo o activan el desarrollo de la enfermedad. Esta hipótesis ha sido comprobada en frutos de diferentes especies; en *Musa paradisiaca* (banano) se identificó como responsable de la actividad inhibitoria al ácido antranílico, el cual cuando el fruto inicia la maduración se transforma en ácido 2,3-dihidroxibenzoico, involucrado en el transporte activo del hierro (García, 2001; Bailey *et al.*, 1992). En algunas especies de *Colletotrichum* existen metabolitos que actúan como quelantes de hierro, y se ha observado que estos estimulan la germinación de esporas o el desarrollo de los apresorios (García, 2001). La disponibilidad del hierro influye en la germinación conidial; estudios citados por Bailey *et al.* (1992), han permitido conocer que las conidias de *C. acutatum* germinan muy poco en medios con altas concentraciones de hierro, pero si la concentración de este es inferior a 10µg/mL la germinación se favorece.

Varios investigadores han planteado que la inhibición de la colonización de los frutos por el hongo, está relacionada con la presencia de compuestos tóxicos en la epidermis de los frutos; los compuestos tóxicos presentes en los frutos inmaduros permiten el desarrollo de los apresorios, pero inhiben su crecimiento posterior, lo

cual se manifiesta con lesiones subcuticulares muy pequeñas (invisibles a simple vista), las cuales reinician su crecimiento cuando empieza el proceso de maduración de los frutos; período en el cual decae la cantidad y calidad del compuesto tóxico debido a transformaciones metabólicas que ocurren durante el proceso de maduración (García, 2001). Sin embargo, Nobel (1981, citado por García, 2001) considera que la hipótesis del aletargamiento relacionado con los cambios en las concentraciones de los compuestos tóxicos que ocurren durante los procesos de maduración de los frutos, no se correlacionan con la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad.

Investigaciones adelantadas por MacCracken y Swinburne (1979); Parbery y Blakeman (1978) y Blakeman y Parbery (1977), registran la existencia de cepas de *Pseudomonas* fluorescentes que poseen sustancias quelantes como los sideróforos, que tienen gran avidéz por el hierro y que en condiciones de deficiencia de hierro, pueden estimular la germinación y la formación de apresorios de *Colletotrichum dematium*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. musae* y posiblemente *C. lindemuthianum*. Blakeman y Parbery (1979, citados por Botero 2001), encontraron cepas de *Pseudomonas fluorescentes* en hojas de remolacha (*Beta vulgaris*) que estimularon la germinación y formación de apresorios de *Colletotrichum acutatum*.

Trabajos realizados por Corpoica, (1999), y Aranzazu y Chiquito (1998), con el hongo *C. gloeosporioides* procedente de tomate de árbol, permitieron observar que el inóculo natural obtenido directamente de los frutos enfermos en el campo es más patogénico que el inóculo puro obtenido *in vitro* (cepas aisladas y purificadas en el laboratorio en medio PDA acidificado). Este hallazgo puede explicar algunos de los resultados negativos o los bajos porcentajes de infección

que se logran en el laboratorio cuando se usa inóculo *in vitro* y no se realiza herida al fruto.

Estudios adelantados por Botero (2001), en frutos de tomate de árbol afectados por Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, permitieron identificar la presencia de una bacteria clasificada como *Pseudomonas aeruginosa* asociada al inóculo natural del hongo; dicha bacteria se comportó como un microorganismo sinergista estimulando la germinación de conidias y la formación de apresorios de *C. gloeosporioides*. Según Neilands (1973, citado por Botero, 2001), *P. aeruginosa* es una bacteria fluorescente que tiene alta afinidad por el hierro.

En frutos de tomate de árbol, Ospina y Aranzazu (1999) y Álvarez y Aranzazu, (1999), determinaron la existencia de infecciones quiescentes ubicadas especialmente en el pedúnculo y zona de unión de éste con el fruto. Aranzazu (1999), encontró cambios en el patrón y ubicación de los síntomas de la enfermedad en los frutos, debidos a las mencionadas infecciones; también encontró que los frutos cercanos a la madurez son los que presentan menor frecuencia de infección.

Estudios epidemiológicos realizados en Colombia en tomate de árbol y mora muestran una correlación positiva con condiciones de clima que favorecen el establecimiento y desarrollo del patógeno. Entre éstas, la humedad relativa, precipitación y temperatura, indicando que las esporas del hongo para germinar además de agua libre sobre el tejido vegetal requieren humedad relativa no inferior a 97%. La luz del sol, la baja humedad relativa y las temperaturas extremas inactivan las esporas. En tomate de árbol la epidemia presenta un comportamiento bimodal durante el año, paralelo a la precipitación y al comportamiento productivo

del árbol (Corpoica, 1999; Aranzazu y Rondón, 1999; Forero de La-Rotta; Ávila y González, 2002). En cuanto a la temperatura, Jenkins (1993) y Holliday (1995 citados por Forero de La-Rotta, Ávila y González, 2002), registran que la temperatura ideal para el desarrollo de la enfermedad esta en el rango de 18°C a 25°C, y que temperaturas inferiores o superiores interfieren con el proceso de infección, permaneciendo el patógeno en estado latente. Sin embargo, en mora se encontró que temperaturas alrededor de 16°C son óptimas para el desarrollo de la enfermedad, y que solo las temperaturas iguales o inferiores a 13°C presentan correlación negativa respecto al progreso de la enfermedad. Al respecto, estos investigadores sugieren que es posible que en las especies vegetales que se ubican en zonas de clima frío moderado el hongo se haya adaptado a esta condición del clima, ya que existen registros sobre la presencia de la enfermedad no solo en cultivos de mora y tomate de árbol, sino también en lulo, curuba y uchuva.

5.5 SÍNTOMAS OCASIONADOS POR *Colletotrichum* EN FRUTOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea* (CAV.) SENDT.), MANZANO (*Malus domestica* BORKH.) Y EN RAMAS DE MORA (*Rubus glaucus* BENTH.)

En **tomate de árbol**, la enfermedad se presenta en cualquier estado de desarrollo del fruto, y se manifiesta inicialmente en forma de pequeñas lesiones o manchas de aspecto aceitoso que gradualmente se toman de color negro, éstas van aumentando de tamaño, cubriendo total o parcialmente el fruto. Las lesiones poseen bordes definidos y el centro deprimido. En condiciones de alta humedad, el centro de la lesión adquiere una tonalidad rosada o salmón, que corresponde a la proliferación de las esporas del hongo. A medida que transcurre el tiempo y la enfermedad progresa, los frutos se secan y se momifican, pudiendo caer al suelo o permanecer adheridos al árbol. A veces las manchas se rodean de una tonalidad

amarillenta y se presenta maduración prematura y caída del fruto (Tamayo y Bernal, 2003; Tamayo, 2001a; Aranzazu y Rondón, 1999; Botero *et al.*, 1999; Saldarriaga, Bernal y Tamayo, 1997; Villa, 1991, 1996; Navarro, 1990; Toro, 1982, 1991; Girard y Lobo, 1987; Girard y Lobo, 1977).

En manzano, los frutos afectados presentan lesiones circulares que se hundan a medida que aumentan de tamaño. Cuando las lesiones alcanzan un diámetro entre 1-3 cm, se observan acérvulos en círculos concéntricos alrededor del punto de infección en los cuales se producen grandes cantidades de conidias. En tiempo seco las conidias en la matriz conidial son de apariencia cristalina, y en condiciones húmedas se toman de color crema o rosado. Al final las lesiones se vuelven negras (Botero *et al.*, 1999; Salazar, Castaño y Castaño, 1997; Salazar y Castaño, 1996). Cuando se desarrollan varias manchas sobre un fruto, lo cual es común, éstas se extienden y fusionan pudriendo todo el fruto el cual puede desprenderse y momificarse, o momificarse y mantenerse adherido al árbol (Agrios, 1991).

En **mora**, las plantas afectadas por Antracnosis presentan manchas oscuras en ramas y tallos que en su interior se toman de color café claro o café rojizo; posteriormente se secan y mueren (Franco y Giraldo, 2000; Franco y Giraldo, 1998), y además, según Montoya, Hincapié y Uribe (1997), las ramas y los tallos afectados (en cualquier estado), se agrietan. Este hongo también puede afectar botones florales, brotes tiernos, pedúnculos y frutos los cuales se deshidratan y pudren (Franco y Giraldo, 2000). El hongo al afectar las ramas laterales ocasiona deformación de los ramilletes florales, los brotes tiernos se ennegrecen y las ramas mueren en forma descendente progresiva (Castro y Díaz, 2001).

Tamayo (2001a), hace la siguiente descripción de los síntomas: "El patógeno se manifiesta ocasionando muerte progresiva y descendente de los brotes y las ramas, quedando los frutos adheridos a éstas. En los tallos y ramas se observan manchas ovaladas de color morado que cubren el tallo de manera parcial o total. Los brotes tiernos de las ramas afectadas se ennegrecen y las hojas recién formadas se marchitan, se tornan amarillas y mueren adheridas a la planta. En ocasiones las lesiones se localizan alrededor de las espinas y se rodean de manchas blancuzcas con diminutos puntos negros. Cuando la infección en los tallos es severa el hongo produce la muerte de la planta".

En los tallos principales, comúnmente alrededor de las espinas se puede observar los acérvulos sobre los cuales en épocas de alta humedad se evidencian coloraciones amarillo intenso-naranja, que corresponden a la esporulación del patógeno. Es frecuente que la enfermedad se presente en los tallos después de las podas avanzando a lo largo de los mismos. En los tallos más viejos se ha podido detectar la presencia de *Glomerella*. En los frutos la enfermedad se encontró esporádicamente, y solo en los maduros; en este caso los frutos enfermos presentaban deshidratación, necrosis y pudrición húmeda con presencia de las estructuras del hongo (Saldarriaga y Bernal, 2000). En trabajos realizados por Forero de La-Rotta, Ávila y González, (2002) en Granada (Cundinamarca), el microorganismo no se encontró en frutos.

Tamayo y Peláez (2000), mencionan que *Colletotrichum gloeosporioides* es más frecuente en frutos maduros que en verdes, en los cuales su expresión es muy baja; lo cual desvirtúa su importancia como problema en este órgano de la planta, presentando mayor trascendencia económica al ocasionar la muerte de tallos y ramas a cultivos de mora ubicados en diferentes regiones de Colombia.

En trabajos adelantados por Cedeño y Palacios-Prü (1991), en Venezuela, encontraron que los síntomas iniciales de la Antracnosis aparecen en la porción basal de las espinas y en los sitios de inserción de los tallos, pecíolos y pedúnculos. Inicialmente aparecen lesiones de color castaño-oscuro que posteriormente se ensanchan y desarrollan un área central castaño-claro con borde castaño-oscuro. En los tejidos infectados bajo condiciones naturales se observan los peritecios del hongo.

Forero de La-Rotta, Ávila y González (2002), encontraron que el agente causante de la enfermedad presenta los estados anamorfo y telemorfo, los cuales se pudieron aislar de diferentes tejidos de la planta; sin embargo, mediante inoculaciones artificiales no se pudo obtener el telemorfo. Estos investigadores también reportaron que los aislamientos presentaron características similares en cuanto a su patogenicidad, pero muestran diferencias en el crecimiento en medio de cultivo artificial, así como en el tamaño y formación de las estructuras reproductivas.

Esta enfermedad se conoce también con el nombre de Palo negro, Muerte descendente o Secadera de la mora (Tamayo, 2001a), y Tuna negra (Montoya, Hincapié y Uribe, 1997).

En Colombia, la Antracnosis está registrada desde los años 90 como una de las 10 enfermedades más importantes en el país por las pérdidas directas que ocasiona en los cultivos y el impacto social y económico que esto representa. Se estima que el 60% de la fruta tropical del país se encuentra infectada por *Colletotrichum*, pues la enfermedad también prevalece en clima cálido y medio (Buritica, 1995).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 LOCALIZACIÓN Y MUESTREO EN CAMPO

Esta investigación se llevó acabo en las zonas productoras de tomate de árbol, mora y manzano en los departamentos de Antioquia y Caldas ubicadas a alturas comprendidas entre 2.000 y 2.550 m.s.n.m; con temperaturas respectivas de 18°C y 12°C, Piso Montano Bajo (tierra fría) (Espinal, 1992).

En Antioquia se adelantaron muestreos en los cultivos de tomate de árbol ubicados en el Altiplano norte en las veredas Pio XII, Cuatroesquinas y Tesorero, del municipio de Enterríos; Teresitas, Malambo, Orobajo, La Muñoz y Balcones pertenecientes a Santa Rosa de Osos. En el municipio de Rionegro en la vereda Llanogrande. Las muestras de mora se colectaron en las siguientes veredas: Hojas Anchas, Santa Clara y La Clarita del municipio de Guarne; en Playa Rica en el municipio de Rionegro; y en la vereda El Llano del corregimiento de Santa Elena, en el municipio de Medellín. En este departamento solo se encontró un cultivo de manzano en el municipio de la Ceja, en el cual no se detectó la Antracnosis.

En el departamento de Caldas, se muestrearon los cultivos de tomate de árbol ubicados en la vereda, Maltería (Tesorito), del municipio de Manizales; Hacienda-Cuba en la zona urbana de Villamaría, y los cultivos de manzano de las veredas Valles y La Florida pertenecientes al municipio de Villamaría y en las localidades de Chulca y Paraíso pertenecientes a la zona urbana del municipio de Manizales.

También se colectaron muestras de manzano en la vereda El Oro en el municipio de Riosucio.

En los cultivos de tomate de árbol se tomaron como muestra los frutos en diferentes estados de desarrollo con síntomas de Antracnosis, y en manzano los frutos en etapa de maduración, con los síntomas de la enfermedad.

En el cultivo de mora se tomaron muestras de tallos con presencia de los síntomas de Antracnosis y los signos del hongo.

Estas muestras se introdujeron en bolsas plásticas rotuladas, se sellaron y depositaron en una caja de icopor y se transportaron al laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Caldas en Manizales; allí se codificaron y se sometieron a los procesos de aislamiento y conservación. En el laboratorio de Fitopatología de Corpoica en el C.I. “La Selva” ubicado en Rionegro – Antioquia se realizaron los estudios morfológicos y en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), en la ciudad de Medellín, se realizaron las pruebas moleculares.

6.2 METODOLOGÍA

A partir de las muestras de campo se llevó a cabo un proceso en tres etapas:

Primera etapa: Se elaboró, codificó y conservó un cepario. **Segunda etapa:** Se realizaron pruebas de patogenicidad y estudios de caracterización morfológica de los aislamientos. **Tercera etapa:** Para complementar la caracterización

morfológica y para determinar la especie o especies del hongo causante(s) de la Antracnosis, se procedió a realizar diagnósticos moleculares mediante PCR y uso de oligonucleótidos (primer o cebadores) específicos.

6.2.1 Primera etapa. Elaboración del cepario: codificación, aislamiento y conservación de las cepas de *Colletotrichum*.

A partir de las muestras colectadas en campo se procedió a asignarles un código en el cual la primera letra corresponde al departamento, la siguiente o las dos siguientes al municipio, luego la letra correspondiente a la vereda o localidad y por ultimo la letra correspondiente al hospedante y a continuación un número que corresponde a la muestra; así el código **ASRTT-2**, corresponde a la muestra dos procedente de Antioquia, Santa Rosa de Osos, vereda Tesorito, cultivo de tomate de árbol.

En el laboratorio las muestras se procesaron individualmente mediante un lavado con agua corriente (del acueducto), luego se sumergieron durante 2 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% (preparada a partir del producto comercial clorox al 5.25%), seguidamente se enjuagaron tres veces consecutivas con abundante agua destilada estéril, e inmediatamente se llevaron a la cámara de flujo laminar (Microvoid air control, Inc. Norristown, USA) en donde con la ayuda de un bisturí N° 11 se tomaron, del borde de la lesión, porciones de aproximadamente 2 mm² de tejido vegetal. Estas porciones se sembraron en cajas de Petri de 9cm de diámetro, servidas con medio de cultivo PDA-acidificado (PDAA). (PDA, medio comercial de la Merck, cuya composición por litro de agua es: infusión de 200 g de papas, D(+) glucosa 20 g y agar-agar 15 g), ajustando el pH a 5.6 con ácido láctico al 0.2%, verificando la acidez con un potenciómetro marca Hanna Instruments 8519. En cada caja de Petri se sembraron distribuidas

en forma equidistante 5 porciones del tejido, sellando los bordes de la caja con una tira de 64 x 4.5 cm de papel Vinilpel (producto comercial marca P.V.C Plásticos vinílicos de Colombiana Ltda). Estas cajas se rotularon y colocaron a incubar en condiciones asépticas en un estante dentro del laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Caldas a 17°C aproximadamente. Cada 24h se verificó el crecimiento y la pureza del hongo (Saldarriaga y Bernal, 2000; Archila *et al.*, 1991; Dhingra y Sinclair, 1985; French y Hebert, 1982).

Trascurridos 5 a 8 días de incubación, cuando se obtuvieron las cepas puras, se tomo de cada una de ellas porciones de 3 x 3 mm y se sembraron en tubos de ensayo de 25 mL de capacidad que contenían agar Sabouraud (medio de cultivo recomendado para la conservación de hongos, cuya composición básica es: peptona 30 g, agar 18 g y agua destilada 1000 mL; ajustando el pH a 5.5 con ácido láctico al 0.2%) (Tello, Vares y Lacasa, 1991; Herrera, 1985). Cuando las cepas, en el tubo, crecieron completamente sobre la superficie del medio, se les adicionó aceite mineral estéril (producto comercial laboratorios Gema) cubriéndolas completamente. Luego se guardaron en nevera (marca Haceb de fabricación Colombiana) a 5°C, para conservar los aislamientos y poder realizar los estudios posteriores (Castaño-Zapata, Del Río y Acosta, 1997; Tello, Fisac y Vares, 1991; Dhingra y Sinclair, 1985; FAO, 1985).

6.2.2 Segunda etapa: Obtención de cultivos monospóricos, pruebas de patogenicidad y estudios biológicos para caracterización morfológica de los aislamientos.

6.2.2.1 Cultivos Monosporicos. Para la caracterización del hongo se partió del cepario conservado en nevera en agar Sabouraud. Se procedió a realizar resiembras en cajas de Petri de 5 cm de diámetro servidas con 5 mL del mismo

medio; cuando en éstas se observó el crecimiento y la esporulación del hongo; con la ayuda de una espátula recta estéril se tomó parte de la masa de conidias y se llevó a un vial con 2 mL de agua destilada estéril, se agito manualmente la suspensión y se vació en cajas de Petri de 9 cm de diámetro servidas cada una con 10 mL de agar-agua al 15/1000 (agar producto comercial de la Oxoid, el cual es una sustancia a base de algas marinas), luego se retiró el exceso de agua de la caja de Petri y se colocó a incubar en posición invertida a temperatura ambiente del laboratorio del C.I. "La Selva" (20°C aproximadamente) por 24h; al cabo de las cuales se realizaron observaciones al microscopio compuesto (marca Olympus BH-2) para detectar la germinación de las conidias, y con la ayuda de un cazaesporas (implemento de fabricación artesanal) se señalaron individualmente las conidias germinadas que se encontraron bien separadas unas de otras, y luego se seleccionó una conidia que se transfirió a una caja de Petri servida con PDA-acidificado, la cual se selló y se colocó a incubar en condiciones del laboratorio. Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas conservadas, con el fin de obtener en esta forma los cultivos monospóricos del hongo (French y Hebert, 1982).

Los cultivos monospóricos también se conservaron en tubos de ensayo de 25 mL siguiendo el procedimiento ya descrito para la conservación de las cepas.

6.2.2.2 Pruebas de Patogenicidad. Cada uno de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. procedentes de los diferentes hospedantes fueron sometidos a una prueba de patogenicidad en su respectivo hospedante, para lo cual en el caso de tomate de árbol se cosecharon frutos pintones (que estaban iniciando maduración), se lavaron con agua corriente, luego se desinfectaron durante 1min con hipoclorito de sodio al 2% y se enjuagaron con agua destilada estéril, inmediatamente se llevaron a una caja de plástico de 25 cm de largo, 17 cm de

ancho y 12 cm de profundidad, equipada con la respectiva tapa y una rejilla plástica sobre la cual se depositaron 10 frutos/caja. Los frutos permanecieron en las cajas durante 7 días, al cabo de los cuales se revisaron para descartar infecciones de campo; verificado lo anterior se procedió a realizar las inoculaciones con una suspensión del hongo a una concentración de 1.2×10^6 conidias/mL de agua. Igual procedimiento se llevó a cabo en frutos maduros de manzano. El conteo de las conidias se realizó en una cámara de Neubauer (marca counting-chamber, Blood mixing). En la preparación del inóculo se usaron aislamientos esporulados de los cultivos monóspóricos. A las cajas de Petri, con el hongo esporulado, se les adicionó 5 mL de agua destilada estéril y con la ayuda de una espátula estéril se removió el hongo y se filtró a través de un tul de organza (tela comercial de tejido muy fino); e inmediatamente se procedió a realizar el conteo de las conidias, ajustándose la concentración a 1.2×10^6 conidias/mL de agua (Chiquito, 1998; Barthelemy, Dawson y Lee, 1984; French y Hebert, 1982; Hartung, Burton y Ramsdell, 1981). Con esta suspensión se asperjaron 10 frutos de cada especie hospedante por cada aislamiento del hongo a probar. A estos frutos se les produjeron pequeñas heridas mediante pinchazos con una aguja fina estéril, en un área de la zona ecuatorial, e inmediatamente se asperjó el sitio con 1 mL de la suspensión de conidias cubriendo completamente el área. Para tal efecto se usó un aspersor comercial de fabricación colombiana referenciado como "Mini plastihogar" de 220 mL de capacidad. Los frutos inoculados se colocaron en cámaras húmedas consistentes en cajas plásticas transparentes con tapa y rejilla (ya descritas) en cuyo fondo se adicionó agua destilada estéril sin tocar la rejilla sobre la cual se depositaron los 10 frutos procurando que no quedaran en contacto unos con otros. Las cajas con los frutos se almacenaron en un cuarto frío controlado a 17.5°C. Para cada uno de los aislamientos se colocó un testigo, conformado por 5 frutos de la especie hospedante para cada aislamiento del hongo a probar. A éstos frutos se les aplicó agua destilada estéril y se conservaron en las mismas condiciones de los tratamientos (Dhingra y Sinclair, 1985; FAO, 1985; French y Hebert, 1982).

En el caso de la mora, las pruebas de patogenicidad se realizaron en tallos correspondientes a las ramas principales de plantas de 5 meses y medio de edad, previamente cultivadas en condiciones de invernadero en el C. I. La Selva. Cada aislamiento se probó sobre 5 plantas; en cada una de las plantas se inoculó el hongo sobre dos ramas, dejando otras dos ramas como testigo o control. La inoculación se realizó sobre una superficie del tallo (de aproximadamente 1 cm² previamente punzada con una aguja fina estéril aplicando 10 pinchazos distribuidos en el área), e inmediatamente se asperjó el sitio con la suspensión de conidias (1.2 x 10⁶ conidias/mL) y se colocó una mota de algodón mojado con agua destilada estéril sobre el sitio por 48h.

Los tratamientos se revisaron diariamente con el fin de detectar y registrar la presencia de síntomas de Antracnosis, así como el tiempo transcurrido para la aparición de los síntomas. Las variables registradas fueron número de aislamientos patogénicos en cada una de las especies vegetales, tiempo transcurrido para la manifestación de síntomas iniciales de Antracnosis, aparición de masas conidiales, tamaño de lesiones y estado de los frutos al cabo de 22 días de la inoculación. En el caso de los tratamientos en mora, las plantas permanecieron en observación durante 3 meses, bajo condiciones de invernadero en el C.I. "La Selva".

Para la realización de las pruebas de patogenicidad se consideraron los resultados y metodologías de varios investigadores (Chiquito, 1998; Madden, Yang y Wilson 1996; Navarro y Puerta, 1991; Saldarriaga, 1989; Dhingra y Sinclair, 1985; FAO, 1985; Latham y Williams, 1983; French y Hebert, 1982; Hartung, Burton y Ramsdell, 1981; Navarro y Puerta, 1978).

En esta prueba se uso un diseño completamente al azar con 41 tratamientos (correspondientes a los aislamientos), y 10 repeticiones. El análisis de varianza y la comparación de medias mediante la prueba de Duncan a nivel del 5% se realizó para la variable diámetro de lesiones en frutos de tomate de árbol y manzano.

En mora, solo se observó la presencia o no de los síntomas de la enfermedad en los tallos de las plantas sometidos al tratamiento.

6.2.2.3 Caracterización morfológica de los aislamientos. A partir del cepario de cultivos monospóricos conservados, se seleccionaron los aislamientos que resultaron patogénicos al hospedante del cual se aislaron, como también un aislamiento no patogénico al mismo hospedante; a estos se les realizó la caracterización morfológica y el diagnóstico molecular.

Cada uno de los aislamientos se consideró como un tratamiento y se reactivó en cajas de Petri servidas con PDA-acidificado (PDAA), para luego ser resembrado al cabo de 5 días. Para tal efecto, cada aislamiento se repicó en 10 cajas de Petri de 9 cm de diámetro servidas cada una con 13 mL de PDA-acidificado (con el propósito de tener tratamientos con 10 repeticiones cada uno). Para la resiembra de dichos tratamientos se tomó, con un sacabocados, de la parte media de la cepa del hongo reactivado un disco de 0.5cm de diámetro e inmediatamente se depositó en el centro de cada caja de Petri (Smith y Black, 1990; Latham y Williams, 1983). Las cajas de Petri resembradas se sellaron con papel Vinilpel y se colocaron en condiciones asépticas en el laboratorio de Fitopatología del C. I." La Selva", empleando un diseño completamente al azar. Los tratamientos se revisaron diariamente para registrar coloración de la cepa, tipo o aspecto del micelio, crecimiento miceliar (tasa de crecimiento en cm/día) (Freeman, Katan y

Shabi, 1998; Adaskaveg y Hartin 1997; Smith y Black, 1990; Hartung, Burton y Ramsdell, 1981). Para los procedimientos y registro de la información relacionada con los caracteres morfológicos, se consideraron aspectos metodológicos de los trabajos llevados a cabo por Adaskaveg y Hartin (1997), Smith y Black (1990), Latham y Williams (1983), Hartung, Burton y Ramsdell (1981), así como las metodologías referenciadas por Tello, Vares y Lacasa (1991), Archila *et al.* (1991), Dhingra y Sinclair (1985), FAO (1985), Barthelemy, Dawson y Lee (1984), French y Hebert (1982). Por cada aislamiento se tomaron 100 conidias a las que se les midió el largo y ancho, esto se llevó a cabo comparando su dimensión con una escala previamente calibrada (ocular micrométrico) dispuesta en el ocular del microscopio Olympus CH-2 (Hartung, Burton y Ramsdell, 1981; Barthelemy, Dawson y Lee, 1984; French y Hebert, 1982). Los detalles para la calibración del ocular micrométrico se registran en el Anexo 2. A cada aislamiento también se le realizó un microcultivo con el propósito de observar al microscopio de manera inalterada las características morfológicas de las estructuras como el micelio, las conidias, los conidióforos, los apresorios, los acérvulos, las setas y cualquier otra estructura que se pudiera presentar (Dhingra y Sinclair, 1985). El procedimiento para la aplicación de la técnica se registra en el Anexo 3.

Para las pruebas de laboratorio se empleo un diseño estadístico completamente al azar, donde la unidad experimental estuvo conformada por una caja de Petri con 10 repeticiones para la variable crecimiento micelial en cada uno de los aislamientos. Para la variable tamaño de conidias en cada uno de los tratamientos (aislamientos) se tomaron 100 conidias a las que se les midió el largo y el ancho. Para las variables mencionadas se realizó el análisis de varianza previa comprobación de la normalidad, y la separación de medias según las pruebas de Duncan y Tukey ambas a nivel del 5%.

6.2.3 Tercera etapa: Realización de los diagnósticos moleculares mediante PCR y uso de cebadores específicos.

6.2.3.1 Crecimiento del hongo. A partir del cepario de cultivos monospóricos conservados, se seleccionaron los aislamientos patogénicos al hospedante del cual se aislaron; también se seleccionó un aislamiento no patogénico al mismo hospedante, así como una cepa del hongo (procedente de tomate de árbol de La Ceja) perteneciente a la colección de trabajo del "C.I La Selva". Éstos aislamientos se colocaron individualmente en el medio PDAA y posteriormente, mediante corte superficial (sin arrastrar medio de cultivo), cada uno de los aislamientos fue transferido a un Erlenmeyer de 250 mL servido con 40 mL de medio líquido Sabouraud, al cual se le adicionó 100 mg del antibiótico Enrofloxacin (producto comercial Genfar®) para suprimir el crecimiento de bacterias asociadas al hongo. El medio con el hongo era observado diariamente para garantizar el crecimiento puro; en algunos casos se aplicó cada 2 días 10 mg del antibiótico, hasta que no se volviera a observar al microscopio la más mínima presencia de células bacteriales. Los aislamientos que no estuvieron completamente puros fueron descartados para los análisis moleculares, considerando los aspectos documentados por Dyer y Kurt (2000). En este medio el hongo creció durante 11-15 días a temperatura ambiente (26°C) en el laboratorio de la CIB (Unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB), para luego ser colectado, lo cual se realizó mediante la eliminación del medio líquido y el enjuague del hongo con agua destilada estéril hasta eliminar completamente el medio de cultivo, posteriormente, el hongo puro se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel toalla en condiciones asépticas, y se almacenó a -70°C en nevera Harris.

6.2.3.2 Extracción del ADN y cuantificación. A partir de 27 aislamientos del hongo conservados a -70°C se realizó la extracción del ADN siguiendo el método descrito por Reader y Broda (1985), con algunas modificaciones descritas a

continuación: Cada cepa del hongo fue macerada completamente en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino; luego este macerado se llevó a tubos eppendorf de 1.5 mL, adicionando el hongo macerado hasta ocupar un volumen de 1.0 mL en el tubo. A cada tubo previamente rotulado y con la respectiva muestra del hongo se le adicionaron 350 μ L de buffer de extracción CTAB 2x (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% p/v CTAB), previamente calentado a 65°C., y 4 μ L de β -mercaptoetanol. Esta mezcla se agitó suavemente y se llevó a baño maría (Polyscience waterbath) a 65°C., por 45 min, agitando suavemente cada 10 min. Trascurrido este tiempo las muestras se llevaron a cámara de extracción (Albel C.E.G.A) y a cada tubo se le adicionaron 350 μ L de Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, e inmediatamente se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C (en una cetrífuga JOUAN MR 14.11). El sobrenadante de cada muestra se colectó en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL (debidamente rotulado), y se adicionó a cada uno de ellos 350 μ L de Cloroformo, luego se sometieron a centrifugación a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C. Se colectó nuevamente el sobrenadante de cada muestra y se volvió a adicionar el mismo volumen de cloroformo y se sometió nuevamente a las mismas condiciones de centrifugación. Cuando el sobrenadante en cada tubo se observó limpio y transparente, se procedió a precipitar el ADN, para lo cual se transfirió 1 mL de cada muestra con el ADN del hongo a tubos eppendorf de 1.5 mL debidamente rotulados; luego se adicionó a cada tubo con muestra 700 μ L de isopropanol y se almacenó durante 1h a -20°C. Trascurrido este tiempo se realizó una centrifugación a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C. para después eliminar cuidadosamente el sobrenadante; el precipitado obtenido se dejó secar durante 2 min al ambiente invirtiendo los tubos destapados, luego se procedió a un lavado del ADN precipitado (pellet) adicionando a cada tubo 1mL de Etanol del 75%, procurando que el pellet se despegara del tubo, inmediatamente se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min. Nuevamente se eliminó el alcohol, se escurrieron los pellet y se realizó, de manera similar al anterior procedimiento, un segundo lavado utilizando esta vez 1 mL de Etanol al 90%. Después de este lavado con la

respectiva centrifugación se descartó el Etanol, y el ADN se sometió a un secado a 30°C por 2 min en una centrifuga de vacío (Vacufuge eppendorf Concentrator 53g), colocando los tubos destapados y centrifugando a 1.400 rpm. Después del secado, el ADN de cada tubo fue resuspendido en 100 µL de buffer TE (1M Tris-HCL, pH 8.0 y 0.5M EDTA, pH 8.0 y se almacenó a 4°C hasta el día siguiente, cuando a cada tubo con la muestra se le agregó 10 mg/mL de RNAsa (USB) y se incubó a 37°C durante 1h en baño maría. Terminado el período de incubación, el ADN de los aislamientos se almacenó a 4°C para ser utilizado en posteriores estudios. El ADN se observó bajo luz ultravioleta mediante una electroforesis en gel de agarosa 0.8% con bromuro de Etidio (10 mg/mL).

La cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante espectrofotometría en un equipo Perkin Elmer, lambda UV /VIS spectrometer. Program 649-5 nm 0.276 A M3 Ratio 260/ 280 nm. Para la cuantificación se prepararon diluciones 2:1000 (2µL de la muestra en 998 µL de buffer TE) a partir de las muestras de ADN conservadas a 4°C. Como blanco se uso buffer TE. Realizada la cuantificación se prepararon diluciones a 100 ng/µL, del ADN de cada uno de los aislamientos.

6.2.3.3 PCR diagnóstica. Para la identificación del hongo, se recurrió a un método molecular, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Delgado, 2002; Ferreira y Grattapaglia, 1998; Mullis, 1994). La PCR es una técnica que se aplica en el diagnóstico de especies, mediante la utilización de oligonucleótidos diseñados para la identificación específica. Para el diagnóstico de las especies de *Colletotrichum* se usaron los siguientes oligonucleótidos; CgInt: 5'GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG^{3'} para la especie *Colletotrichum gloeosporioides*, y para la especie *Colletotrichum acutatum* Caint-2: 5'GGCGCCGGCCCCGTACGGGG^{3'} (estos oligonucleótidos amplifican regiones ITS específicas para cada una de estas dos especies del hongo); cada uno de

dichos oligonucleótidos se usó con el oligonucleótido inespecífico ITS-4: $5^{\prime}\text{TCCTCCGCTTATTGATATGC}^3$, que amplifica regiones conservadas del ADN ribosomal (Adaskaveg y Hartin, 1997).

Las reacciones se hicieron de la siguiente manera: 2.5 μL de buffer de PCR (Invitrogen) 10X (50 mM KCl y 10 mM Tris-HCl, pH 8.5); 1.5 μL de MgCl_2 (50 mM); 0.5 μL , (10 mM) de los nucleótidos, dATP, dCTP, dGTP y dTTP (promega); 0.7 μL , (25 picomolar) de cada uno de los oligonucleótidos (Cgint ó Caint y ITS4); 1 μL (100 ng) de ADN; 0.125 μL (2.0 unidades) de taq polimerasa (promega), todo llevado a un volumen final de 25 μL (el volumen se completo con agua desionizada estéril). Se dejó un control negativo para la PCR consistente en la mezcla de los reactivos, pero sin adicionarles el ADN. También se usaron los respectivos controles positivos para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer 9600), con una temperatura inicial de 94°C por 1 min, seguido de 34 ciclos así: 94°C por 1 min; 59°C por 2 min y 72°C por 2 min, seguidos por un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C para *C. gloeosporioides*. Para *C. acutatum* las condiciones fueron: una temperatura inicial de 94°C por 1 min, seguido de 34 ciclos así: 94°C por 1 min; 61°C por 2 min y 72°C por 2 min, seguidos por un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C.

La electroforesis se realizó a 70 V durante 1 h y 30 min en gel de agarosa al 0.8% (80 mL TBE 0.5X + 0.64 g de agarosa Gibco BRL), con 8 μL de bromuro de Etidio (10 mg/mL). Los productos de las reacciones se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 PRIMERA ETAPA: ELABORACIÓN DEL CEPARIO: CODIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE *COLLETOTRICHUM*

De acuerdo con la metodología propuesta, en la Tabla 1, se relacionan las cepas de *Colletotrichum* spp. colectadas en los diferentes hospedantes.

El cepario se conformó con 52 aislamientos, de los cuales, 25 correspondieron a tomate de árbol, 11 a manzano, 14 a mora, y 2 controles positivos de *Colletotrichum gloeosporioides*; uno de éstos procedente de un cepario del Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, cuyos datos de pasaporte son: "accesión 184 de *Stylosanthes guianensis*. Dr. P.R. Mills. Department of Mycology and Plant Pathology. The Queen's University of Belfast. Newforge Lane. Belfast, BT9 5PX, United Kingdom". El segundo aislamiento de *C. gloeosporioides* fue suministrado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA, el hongo fue obtenido de frutos de tomate de árbol procedentes de San Bernardo (Cundinamarca), y se encuentra referenciado bajo el registro: cepa C- 52 (E-393) en la colección existente en el Centro de Investigación Tibaitatá (CORPOICA), ubicado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca).

Tabla 1. Identificación y codificación de las muestras colectadas.

Ítem	Código	Departamento	Municipio	Vereda o Localidad	Hospedante	a.s.n.m
1	ASRTT-1	Antioquia	Santa Rosa	Teresitas	Tomate	2510
2	ASRMT-1	Antioquia	Santa Rosa	Malambo	Tomate	2420
3	ASRBT-1	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	Tomate	2550
4	ASRBT-2	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	Tomate	2550
5	ASROT-1	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	Tomate	2440
6	ASROT-2	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	Tomate	2440
7	ASROT-1	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	Tomate	2420
8	ASRLmT-1	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	Tomate	2420
9	ASRLmT-2	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	Tomate	2420
10	ASRLmT-3	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	Tomate	2390
11	AETT-1	Antioquia	Entrerrios	Tesorero	Tomate	2365
12	AETT-2	Antioquia	Entrerrios	Tesorero	Tomate	2370
13	AEPT-1	Antioquia	Entrerrios	Plo XII	Tomate	2460
14	AEPT-2	Antioquia	Entrerrios	Plo XII	Tomate	2435
15	AEPT-3	Antioquia	Entrerrios	Plo XII	Tomate	2435
16	AECeT-1	Antioquia	Entrerrios	Cuatroesquinas	Tomate	2400
17	ARLLT-1	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	Tomate	2120
18	ARLLT-2	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	Tomate	2120
19	ARLLT-3	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	Tomate	2120
20	ARPrM-1	Antioquia	Rionegro	Playa Rica	Mora	2150
21	ARPrM-2	Antioquia	Rionegro	Playa Rica	Mora	2150
22	AGHaM-1	Antioquia	Guame	Hojas Anchas	Mora	2200
23	AGHaM-2	Antioquia	Guame	Hojas Anchas	Mora	2200
24	AGHaM-3	Antioquia	Guame	Hojas Anchas	Mora	2160
25	AGScM-1	Antioquia	Guame	Santa Clara	Mora	2310
26	AGLcM-1	Antioquia	Guame	La Clarita	Mora	2290
27	AMSEM-1	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	2520
28	AMSEM-2	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	2520
29	AMSEM-3	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	2520
30	AMSEM-4	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	2520
31	AMSEM-5	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	2520
32	AMSEM-6	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	2520
33	CMTT-1	Caldas	Manizales	Tesorito	Tomate	2350
34	CMTT-2	Caldas	Manizales	Tesorito	Tomate	2350
35	CMTT-3	Caldas	Manizales	Tesorito	Tomate	2350
36	CMTUT-1	Caldas	Manizales	Tesorito - Univ	Tomate	2300
37	CMTUT-2	Caldas	Manizales	Tesorito - Univ	Tomate	2300
38	CVMHcT-1	Caldas	Villamaría	Hacienda Cuba	Tomate	1900
39	CMchMa-1	Caldas	Manizales	Chulca	Manzano	2400
40	CVMLfMa-1	Caldas	Villamaría	La Florida	Manzano	2100
41	CVMLfMa-2	Caldas	Villamaría	La Florida	Manzano	2100
42	CVMLfMa-3	Caldas	Villamaría	La Florida	Manzano	2100
43	CVMLfMa-4	Caldas	Villamaría	La Florida	Manzano	2100
44	CVMLfMa-5	Caldas	Villamaría	La Florida	Manzano	2100
45	CVMVMa-1	Caldas	Villamaría	Valles	Manzano	2100
46	CRSEOMa-1	Caldas	Riosucio	El Oro	Manzano	2150
47	CRSEOMa-2	Caldas	Riosucio	El Oro	Manzano	2150
48	CRSEOMa-3	Caldas	Riosucio	El Oro	Manzano	2150
49	CRSEOMa-4	Caldas	Riosucio	El Oro	Manzano	2150
50	CMPM-1	Caldas	Manizales	Paraiso	Mora	2400
51	Accesión 184	Caquetá	Colección de Referencia CIAT		<i>Stylosanthes</i>	-
52	C-52 (E-393)	Cundinamarca	Colección de Referencia Tibaitatá		Tomate	-

Todas las cepas del hongo presentaron un buen crecimiento en el medio PDA acidificado en el cual formaron colonias que cubrieron entre el 80 y 100% de la superficie del medio al cabo de 8 días, bajo condiciones del laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Caldas (Manizales); también cuando se sembraron en el medio Sabouraud solidificado (servido inclinado) en tubos de ensayo, donde las cepas cubrieron completamente la superficie del medio al cabo de 4 –6 días.

7.2 SEGUNDA ETAPA: OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS, PRUEBAS DE PATOGENICIDAD Y ESTUDIOS BIOLÓGICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS

7.2.1 Obtención de cultivos monospóricos. A partir del cepario conformado por 50 aislamientos, elaborado en la primera etapa y conservado durante 3 meses en las condiciones descritas en la metodología, se logró reactivar mediante resiembra en el medio Sabouraud un total de 41 aislamientos, a los cuales se les realizaron cultivos monospóricos con la metodología propuesta, para luego ser conservados y empleados en la realización de las pruebas de patogenicidad y los estudios de caracterización y diagnóstico específico.

En el proceso de reactivación de las cepas se presentaron 9 casos en los que el hongo no creció en el medio Sabouraud, ni en PDA, como tampoco en PDA enriquecido con extracto del hospedante del que provenía la cepa. También se presentaron siete casos en los que el hongo se observó estrechamente asociado a una bacteria. Al aislar la bacteria asociada al hongo, ésta presentó colonias de color blanco -crema en agar nutritivo a las 48 h en condiciones del laboratorio del C.I. "La Selva". En la tinción de Gram (usando los reactivos cristal violeta, yodo, alcohol etílico puro y safranina) se observaron bacilos rectos, Gram negativos,

reconfirmándose el Gram con KOH al 3% (Noval, 1991; Archila *et al.*, 1991; Schaad, 1988). Las pruebas de Movilidad, Oxidasa, Catalasa y O/F arrojaron resultados positivos. En el medio agar - sacarosa y peptona (SPA), transcurridas 48 h las colonias crecieron planas, de color blanco – perla, indicando que el organismo no produce colonias tipo levano; y en el medio agar al extracto de levadura, glucosa y carbonato de calcio (YDC), no se produjo xanthomonadinas (pigmento producido por *Xanthomonas*), que se manifestaran mediante la presencia de colonias amarillas (Noval, 1991; Archila *et al.*, 1991; Schaad, 1988). Del Río y Saucedá (1997), registran que el género *Pseudomonas* posee bacilos rectos, Gram negativos, con metabolismo oxidativo, aerobios y no produce pigmentación tipo *Xanthomonas*. Las investigaciones llevadas a cabo por Botero (2001), Parbery y Blakeman (1978) y Blakeman y Parbery (1977), registran la existencia de cepas de *Pseudomonas* asociadas al inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum musae* y *Colletotrichum dematium*. Los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, así como los registros y reportes existentes, sugieren que posiblemente la bacteria que se encontró asociada con el inóculo de algunos de los aislamientos puede corresponder al género *Pseudomonas*. Los aislamientos fuertemente asociados a la bacteria fueron: ASRLMT-1, AEPT-2, AEPT-3, AETT-1, ARLLT-1, ARLLT-3, y CMTUT-1.

7.2.2 Pruebas de patogenicidad. Estas pruebas se realizaron aplicando los postulados de Robert Koch, los cuales sirven para indicar si el organismo aislado es o no el causante de la enfermedad (Del Río y Saucedá, 1997); en este caso, permiten conocer si los aislamientos del hongo a probar inducen síntomas de Antracnosis en los respectivos hospedantes de los cuales provienen.

En estas pruebas se utilizaron los aislamientos reactivados, de acuerdo con la metodología planteada, y no todos indujeron síntomas de la enfermedad. En la Tabla 2, se presentan los resultados de las pruebas de patogenicidad realizadas con 41 aislamientos; de éstos 20 provenían de tomate de árbol, 7 de manzano y 14 de mora; presentándose un total de 28 aislamientos con capacidad de inducir síntomas de la enfermedad sobre su respectivo hospedante, de éstos aislamientos 18 correspondieron a tomate de árbol, 6 a manzano y 4 a mora; es decir el 68% de los aislamientos del cepario elaborado para el estudio fueron patogénicos. Del grupo de los aislamientos procedentes de tomate de árbol, el 90% resultaron patogénicos en este hospedante; de igual forma, de los procedentes de manzano, el 85% fueron patogénicos sobre frutos de este hospedante; en mora, solo el 28% de los aislamientos resultaron patogénicos al ser inoculados sobre los tallos de este hospedante. Factores como la altura sobre el nivel del mar y la localización geográfica del hospedante, no mostraron correlación con la patogenicidad.

En los frutos de tomate de árbol inoculados, la enfermedad empezó a manifestarse después de 7 a 10 días. Los primeros síntomas consistieron en pequeñas manchas, de aproximadamente 1.5mm de diámetro, redondeadas, de color castaño oscuro, levemente deprimidas. La esporulación del hongo de color rosado-salmón, se observó después de 4 a 6 días de detectados los primeros síntomas; resultados que concuerdan con los obtenidos en los estudios de patogenicidad del agente causal de la Antracnosis del tomate de árbol, llevados a cabo por Corpoica (1999), Aranzazu y Rondón (1999) y Navarro y Puerta (1978). Sin embargo, en los trabajos realizados por Botero (2001), Romero (1999) y Aranzazu y Chiquito (1998), se registra el inicio de los primeros síntomas después de los 5 días de la inoculación; esto puede tener alguna relación con factores de tipo metodológico, interacciones entre el hospedante y el patógeno, además de aspectos de carácter ambiental.

Tabla 2. Resultados de las pruebas de patogenicidad.

Código del Aislamiento	Departamento	Municipio	Vereda o localidad	a.s.n.m.	Hospedante	Patogenicidad
ASRTT-1	Antioquia	Santa Rosa	Teresitas	2510	Tomate	Positivo
ASRMT-1	Antioquia	Santa Rosa	Malambo	2420	Tomate	Positivo
ASRBT-1	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	2550	Tomate	Positivo
ASRBT-2	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	2550	Tomate	Positivo
ASROT-1	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	2440	Tomate	Positivo
ASROT-2	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	2440	Tomate	Positivo
ASRLmT-1	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	2420	Tomate	Positivo
ASRLmT-2	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	2420	Tomate	Positivo
ASRLmT-3	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	2390	Tomate	Negativo
AETT-1	Antioquia	Entrerrios	Tesorero	2365	Tomate	Positivo
AETT-2	Antioquia	Entrerrios	Tesorero	2370	Tomate	Positivo
AEPT-1	Antioquia	Entrerrios	Pío XII	2460	Tomate	Positivo
AEPT-2	Antioquia	Entrerrios	Pío XII	2435	Tomate	Positivo
AEPT-3	Antioquia	Entrerrios	Pío XII	2435	Tomate	Positivo
AECeT-1	Antioquia	Entrerrios	Cuatroesquinas	2400	Tomate	Positivo
ARLLT-1	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	2120	Tomate	Positivo
ARLLT-3	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	2120	Tomate	Positivo
ARPrM-1	Antioquia	Rionegro	Playa Rica	2150	Mora	Negativo
ARPrM-2	Antioquia	Rionegro	Playa Rica	2150	Mora	Negativo
AGHaM-1	Antioquia	Guarne	Hojas Anchas	2200	Mora	Negativo
AGHaM-2	Antioquia	Guarne	Hojas Anchas	2200	Mora	Negativo
AGHaM-3	Antioquia	Guarne	Hojas Anchas	2160	Mora	Negativo
AGScM-1	Antioquia	Guarne	Santa Clara	2310	Mora	Positivo
AGLcM-1	Antioquia	Guarne	La Clarita	2290	Mora	Negativo
AMSEM-1	Antioquia	Medellín	Santa Elena	2520	Mora	Positivo
AMSEM-2	Antioquia	Medellín	Santa Elena	2520	Mora	Positivo
AMSEM-3	Antioquia	Medellín	Santa Elena	2520	Mora	Negativo
AMSEM-4	Antioquia	Medellín	Santa Elena	2520	Mora	Negativo
AMSEM-5	Antioquia	Medellín	Santa Elena	2520	Mora	Negativo
AMSEM-6	Antioquia	Medellín	Santa Elena	2520	Mora	Positivo
CMTT-1	Caldas	Manizales	Tesorito	2350	Tomate	Positivo
CMTT-2	Caldas	Manizales	Tesorito	2350	Tomate	Negativo
CMTUT-1	Caldas	Manizales	Tesorito - univ	2300	Tomate	Positivo
CmchMa-1	Caldas	Manizales	Chulca	2400	Manzano	Positivo
CVMLfMa-1	Caldas	Villamaría	La Florida	2100	Manzano	Negativo
CVMLfMa-3	Caldas	Villamaría	La Florida	2100	Manzano	Positivo
CVMLfMa-4	Caldas	Villamaría	La Florida	2100	Manzano	Positivo
CVMVMa-1	Caldas	Villamaría	Valles	2100	Manzano	Positivo
CRSEoMa-1	Caldas	Riosucio	El Oro	2150	Manzano	Positivo
CRSEoMa-2	Caldas	Riosucio	El Oro	2150	Manzano	Positivo
CMPM-1	Caldas	Manizales	Paraiso	2400	Mora	Negativo

En los frutos de manzana las lesiones se observaron entre los 6 y 8 días después de la inoculación. En este hospedante las lesiones presentaron color castaño

oscuro a negras, redondeadas, inicialmente sin depresión. La esporulación, en forma de acérvulos con masas de conidias distribuidas en la lesión, se observó después de 2 a 3 días de detectada la lesión. A medida que las lesiones aumentaron de tamaño el centro de éstas se fue colapsando, tornándose deprimidas en algunos aislamientos; estos síntomas concuerdan con los descritos por Salazar, Castaño y Castaño (1997) y Latham y William (1983), para el patógeno causante de la Pudrición amarga del fruto de la manzana. Tanto en frutos de tomate de árbol como de manzana las lesiones fueron aumentando su tamaño hasta comprometer gran parte del fruto, presentando diferencias en cuanto a los tamaños y aspecto de las lesiones, como también en la cantidad de esporulación del hongo sobre dichas lesiones (Figuras 1). Los frutos que se emplearon como controles permanecieron sanos.

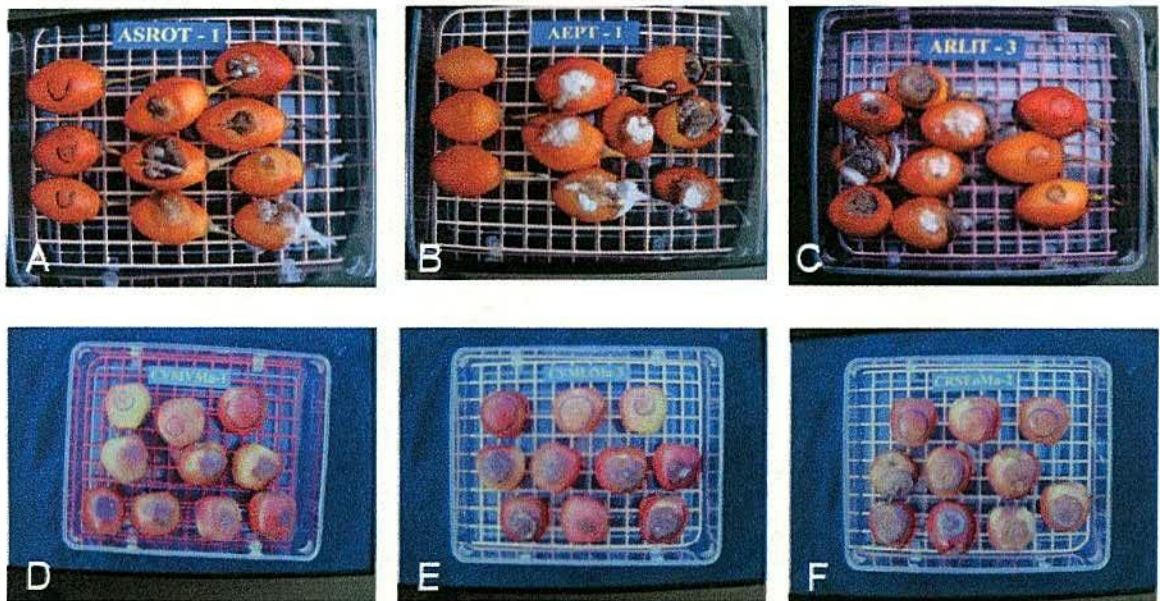


Figura 1. Aspecto de las lesiones a los 22 días de la inoculación. **A, B, C.** Antracnosis en frutos de tomate de árbol. **D, E, F.** Antracnosis en frutos de manzana.

En tomate de árbol los diámetros de las lesiones, después de 22 días de la inoculación, fluctuaron entre un valor mínimo de 3.93 cm en el aislamiento ASRMT-1, y 11.76 cm en el aislamiento CMTT-1; lo cual muestra un amplio rango de variación en los tamaños de las lesiones. Al realizar la prueba de Duncan se conformaron 13 grupos; siete de los cuales estaban compuestos por un solo aislamiento, y seis por más de uno, con escaso traslape (Tabla 3). Esto significa que la gran mayoría de los aislamientos presentaron una variación altamente significativa (Anexo 4). Estas diferencias no se pueden atribuir separadamente al patógeno o al hospedante, pero sí a una interacción entre ambos. Teniendo en cuenta que los frutos inoculados no provienen de una población uniforme genéticamente, los hospedantes (frutos) pueden responder de manera diferente a la presencia del hongo. Esto concuerda con los trabajos desarrollados por Romero (1999), Corpoica (1999) y Tamayo (1984), quienes registran diferencias de patogenicidad cuando se realizan inoculaciones de una misma cepa o aislamiento del hongo sobre frutos de tomate de árbol procedentes de diferentes materiales o ecotipos; como también cuando se prueban diferentes cepas del hongo sobre un mismo material o ecotipo.

También se debe considerar la gran variabilidad de *Colletotrichum*, aspecto ampliamente registrado en la literatura, sobre el cual aún surgen muchas preguntas relacionadas con el origen de la variación y los mecanismos de patogénesis entre otros (Bryson *et al.*, 1992; Mills, Hodson y Brown, 1992).

En la Tabla 3, se observa que los aislamientos ARLLT-1, AEPT-3, ARLLT-3, CMTUT-1 y AETT-1, que presentaron los mayores tamaños de lesiones estaban estrechamente asociados a una bacteria, posiblemente del género *Pseudomonas*, que la literatura reporta como un factor de patogenicidad adicional al del hongo.

Tabla 3. Diámetro de las lesiones de Antracnosis en frutos de tomate de árbol a los 22 días de la inoculación.

Código del aislamiento	Departamento	Municipio	Localidad	a.s.n.m	Diámetro promedio de las lesiones (cm)
CMTT-1	Caldas	Manizales	Tesorito	2350	11.76 a
ARLLT-1**	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	2120	9.41 b
AEPT-3**	Antioquia	Entrerrios	Pío XII	2435	6.84 c
ARLLT-3**	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	2120	6.54 d
CMTUT-1**	Caldas	Manizales	Tesorito-Univ	2300	5.90 e
AETT-1**	Antioquia	Entrerrios	Tesorero	2365	5.76 f
AETT-2	Antioquia	Entrerrios	Tesorero	2370	5.75 f
AEPT-1	Antioquia	Entrerrios	Pío XII	2460	5.57 g
AEPT-2**	Antioquia	Entrerrios	Pío XII	2435	5.51 gh
ASRLmT-2	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	2420	5.41 h
ASRTT-1	Antioquia	Santa Rosa	Teresitas	2510	5.26 i
ASRBT-2	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	2550	5.23 i
ASROT-2	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	2440	4.83 j
AECET-1	Antioquia	Entrerrios	Cuatroesquinas	2400	4.73 j
ASRBT-1	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	2550	4.59 k
ASRLmT-1**	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	2420	4.15 l
ASROT-1	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	2440	4.06 l
ASRMT-1	Antioquia	Santa Rosa	Malambo	2420	3.93 i

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa al nivel del 1%.

**Aislamientos fuertemente asociados a la bacteria.

Botero (2001), MacCraken y Swinburne (1979), Parbery y Blakeman (1978), y Blakeman y Parbery (1977), entre otros, registran la existencia de bacterias *Pseudomonas* fluorescentes que poseen sustancias quelantes que estimulan la germinación de las conidias y la formación de apresorios de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*, favoreciendo el proceso de infección.

En manzana también hubo una variación altamente significativa en los tamaños de las lesiones de los frutos, pero hubo un mayor traslape entre los tratamientos (aislamientos) (Tabla 4 y Anexo 5). Los tamaños de las lesiones fluctuaron entre 3.25 cm correspondiente al aislamiento CRSEoMa-1 (el cual es significativamente

diferente del resto), y 5.17 cm correspondiente al aislamiento CRSEoMa-2; este no presentó diferencias significativas con los tratamientos CVMLfMa-4 y CMChMa-1, pero si con los tratamientos CVMLfMa-3, CVMVMa-1 y CRSEoMa-1.

Tabla 4. Diámetro de las lesiones de Antracnosis en frutos de manzana a los 22 días de la inoculación.

Código del aislamiento	Departamento	Municipio	Localidad	a.s.n.m	Diámetro promedio de las lesiones (cm)
CRSEoMa-2	Caldas	Rio Sucio	El Oro	2.150	5.17a
CVMLfMa-4	Caldas	Villa Maria	La Florida	2.100	4.91 ab
CMChMa-1	Caldas	Manizales	Chulca	2.400	4.77 ab
CVMLfMa-3	Caldas	Villa Maria	La Florida	2.100	4.50 bc
CVMVMa-1	Caldas	Villamaría	Valles	2.100	4.15 c
CRSEoMa-1	Caldas	Rio Sucio	El Oro	2.150	3.25 d

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa al nivel del 1%.

En el caso de la mora, el aislamiento AGSCM –1 proveniente de Santa Clara en el municipio de Guarne, y los aislamientos AMSEM –1; AMSEM –2 y AMSEM –6 del corregimiento Santa Elena (Medellín), produjeron los síntomas de la enfermedad después de transcurridos 13 a 20 días de la inoculación. Los síntomas se manifestaron mediante una lesión de color azul-violeta intenso, con bordes definidos que fue progresando hasta rodear y cubrir el tallo, y después de 17 a 28 días de la inoculación aparecieron diminutos puntos negros, correspondientes a los acérvulos del hongo que contenían las conidias. Transcurridos 50- 75 días de la inoculación se empezó a manifestar una clorosis, y a los 80 a 90 días las ramas murieron del sitio de la lesión hacia la parte terminal, con las hojas adheridas al tallo (Figura 2). Las ramas que se usaron como controles no desarrollaron lesiones permaneciendo sanas. Estos síntomas concuerdan con los descritos por Forero de La-Rotta, Ávila y González (2002), Tamayo (2001a), Tamayo y Peláez (2000) y Saldarriaga y Bernal (2000), para el patógeno causante de la Antracnosis de la mora de Castilla.

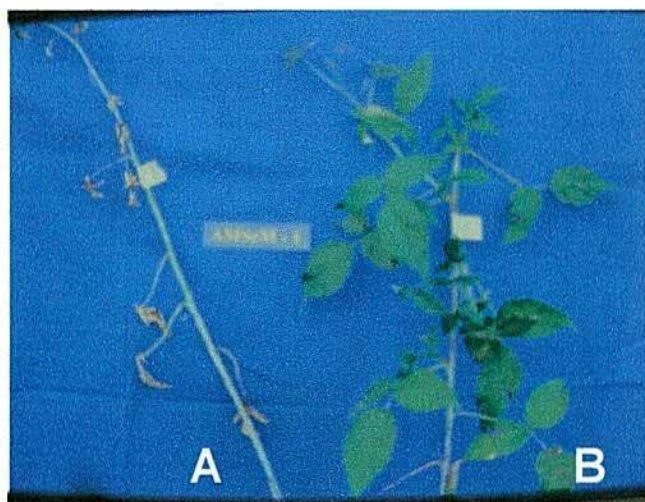


Figura 2. Síntomas de Antracnosis en ramas de mora a los 80 días de la inoculación. **A.** Rama inoculada con el hongo, **B.** Rama testigo o control.

Forero de La-Rotta, Ávila y González (2002), reportan una temperatura óptima de 16°C para el desarrollo de la enfermedad en este cultivo; Jenkins (1993) y Holliday (1995), citados por Forero de La-Rotta, Ávila y González (2002), consideran que una temperatura ideal para el desarrollo de la enfermedad fluctúa entre 18°C y 25°C. y que las temperaturas inferiores o superiores pueden afectar el desarrollo de la enfermedad o hacer que el organismo permanezca en estado de latencia. Otros factores involucrados en el incremento del área de las lesiones son la humedad relativa y la precipitación. Forero de La-Rotta, Ávila y González (2002), encontraron una alta correlación entre el incremento de la lesión y la humedad relativa superior a 85%. González *et al.* (2003), encontraron en sus estudios que el tipo de tejido de la planta también tenía relación con el avance y severidad de la enfermedad, siendo más susceptibles los tejidos más suculentos. Estos factores y otros aún no estudiados en este cultivo como la edad de la planta, el factor nutricional, las prácticas de manejo del cultivo, los condicionantes de infecciones latentes o quiescentes, pueden tener relación con la expresión de los síntomas y el desarrollo de la enfermedad. Según CABI/EPPO (1994), debe existir unas

condiciones adecuadas para que el hongo pueda crecer rápidamente dentro de la planta y causar síntomas, sin embargo, cuando dichas condiciones no se dan el hongo puede permanecer quiescente en los tejidos por un periodo de tiempo o llegar solamente a aparecer después de la cosecha. Waller (1992), menciona que la variabilidad en el periodo de latencia del hongo, representa una adaptación importante a las condiciones de la fisiología del tejido del hospedante y a las condiciones climatológicas que ocurren durante el ciclo del cultivo.

Dodd *et al.* (1991, citados por Botero, 2001), consideran que las diferencias en la patogenicidad de una cepa pueden ser consecuencia de las interacciones del medio ambiente, la secreción de enzimas del hongo y el genotipo del hospedante.

En este trabajo las plantas inoculadas con el hongo estuvieron sometidas a un ambiente en invernadero con temperaturas comprendidas entre 12°C y 28°C y una humedad relativa alrededor del 78%; estas condiciones no encajan estrictamente en las mencionadas por Forero de La-Rotta, Ávila y González (2002), como óptimas para el desarrollo de la enfermedad en mora; por consiguiente, las fluctuaciones de temperatura y la humedad relativa, por fuera de los límites considerados apropiados por estos investigadores, son factores que pudieron haber incidido en el desarrollo de la enfermedad y en la expresión de los síntomas en las plantas inoculadas con algunas cepas del hongo; pues sólo el 28% de los aislamientos del hongo provenientes de este hospedante se comportaron como patogénicos.

7.2.3 Caracterización morfológica de los aislamientos. Los aislamientos seleccionados para la caracterización morfológica de acuerdo con lo planteado en la metodología, se relacionan en la Tabla 5.

Tabla 5. Aislamientos seleccionados para caracterización morfológica.

Item	Código	Departamento	Municipio	Localidad	Hospedante	Patogenicidad
1	ASRTT-1	Antioquia	Santa Rosa	Teresitas	Tomate	Positivo
2	ASRMT-1	Antioquia	Santa Rosa	Malambo	Tomate	Positivo
3	ASRBT-1	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	Tomate	Positivo
4	ASRBT-2	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	Tomate	Positivo
5	ASROT-1	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	Tomate	Positivo
6	ASROT-2	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	Tomate	Positivo
7	ASRLmT-1	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	Tomate	Positivo
8	ASRLmT-2	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	Tomate	Positivo
9	ASRLmT-3	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	Tomate	Negativo
10	AEPT-1	Antioquia	Entrerrios	Pío XII	Tomate	Positivo
11	AEPT-2	Antioquia	Entrerrios	Pío XII	Tomate	Positivo
12	AEPT-3	Antioquia	Entrerrios	Pío XII	Tomate	Positivo
13	AECET-1	Antioquia	Entrerrios	Cuatroesquinas	Tomate	Positivo
14	AETT-1	Antioquia	Entrerrios	Tesorero	Tomate	Positivo
15	AETT-2	Antioquia	Entrerrios	Tesorero	Tomate	Positivo
16	ARLLT-1	Antioquia	Rionegro	Lanogrande	Tomate	Positivo
17	ARLLT-3	Antioquia	Rionegro	Llanogrande	Tomate	Positivo
18	AGScM-1	Antioquia	Guarne	Santa Clara	Mora	Positivo
19	AMSEM-1	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	Positivo
20	AMSEM-2	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	Positivo
21	AMSEM-5	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	Negativo
22	AMSEM-6	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	Positivo
23	CMTT-1	Caldas	Manizales	Tesorito	Tomate	Positivo
24	CMTUT-1	Caldas	Manizales	Tesorito - Univ	Tomate	Positivo
25	CMChMa-1	Caldas	Manizales	Chulca	Manzano	Positivo
26	CVMVMa-1	Caldas	Villamaría	Valles	Manzano	Positivo
27	CVMLfMa-1	Caldas	Villamaría	La Florida	Manzano	Negativo
28	CVMLfMa-3	Caldas	Villa María	La Florida	Manzano	Positivo
29	CVMLfMa-4	Caldas	Villa María	La Florida	Manzano	Positivo
30	CRSEoMa-1	Caldas	Río Sucio	El Oro	Manzano	Positivo
31	CRSEoMa-2	Caldas	Río Sucio	El Oro	Manzano	Positivo
32	E393	Cundinamarca	Cepa C-52 de Referencia CORPOICA		Tomate	Positivo
33	Accesión 184	Caquetá	Cepa de Referencia CIAT		Stylosanthes	Positivo

A estos aislamientos se les registró coloración de la cepa, tipo o aspecto del micelio, tasa de crecimiento. A nivel microscópico se registraron características tales como: forma y tamaño de las conidias, y en los microcultivos aspectos del

micelio, conidióforos, acérvulos, presencia de setas y otras estructuras. En la Tabla 6, se presentan los resultados de la caracterización morfológica de los aislamientos.

Coloración de las cepas. Los colores exhibidos por los aislamientos o cepas del hongo, trascurridos 10 días de la siembra en PDA acidificado y almacenados a 17°C de temperatura fueron variables, entre y dentro de los tratamientos (aislamientos), predominando los fondos de colores naranja combinado con el gris, amarillo o blanco y marrón, con agregados de masas conidiales de diferentes tonalidades del naranja y de acérvulos de color castaño a negro, distribuidos en la mayoría de los casos en forma de anillos concéntricos sobre la superficie de la cepa. En la Figura 3, se ilustra la variabilidad en la coloración de las cepas.

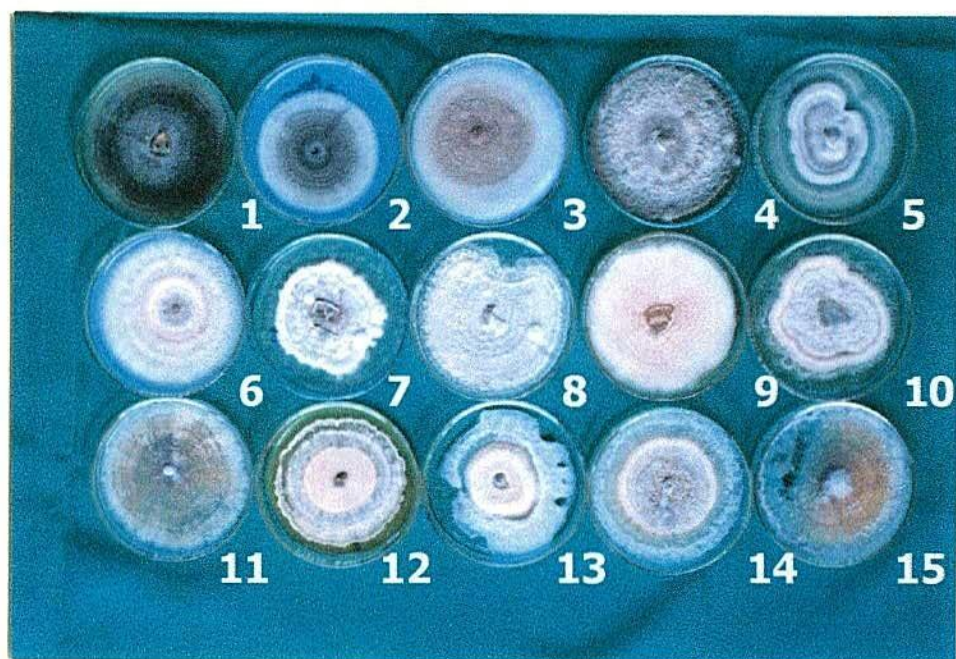


Figura 3. Coloración de las cepas a los 10 días de crecimiento en PDA-acidificado. De izquierda a derecha: 1) Accesoión 184 CIAT, 2) E393, 3) ASRLmT-1, 4) AMSEM-2, 5) CVMLfMa-4, 6) CMchMa-1, 7) ASRBT-1, 8) AETT-1 9) AGScM-1 10) ASRLmT-2, 11) ASRBT-1, 12) AECeT-1, 13) CVMLfMa-3, 14) ASRTT-1 y 15) ASRLmT-3.

El color de fondo se presentó indistintamente entre las cepas patogénicas y no patogénicas. Las cepas patrones presentaron las siguientes coloraciones: gris-verdoso para la cepa E393 de CORPOICA y verde-café-negro para accesión 184 del CIAT. Con el transcurso del tiempo se observaron cambios en la coloración de las cepas. Las variaciones en el color de las cepas son comportamientos normales que han sido encontrados y reportados por otros investigadores, entre ellos Vinnere (2004), Wharton y Diéguez (2004) y Freeman, Katan y Shabi (1998), por lo cual se sugiere tener precaución cuando se usa ésta característica para separar las especies.

Tipo y aspecto del micelio. En la Tabla 6, se registra el tipo de micelio observado en los aislamientos; en los datos allí consignados, se encuentra que cerca del 70% de las cepas presentaron un crecimiento ralo-superficial del micelio; otras cepas presentaron un crecimiento micelial ralo superficial con agregados miceliales de aspecto grumoso o agregados de micelio denso de aspecto algodonoso, distribuidos irregularmente por toda la cepa o en ocasiones formando anillos. Los aislamientos correspondientes a las cepas de referencia (Accesión CIAT 184 y E-393 CORPOICA) presentaron un crecimiento micelial ralo superficial.

Al microscopio se observó un micelio hialino, septado, con inclusiones citoplasmáticas, y variaciones en su morfología a medida que la cepa envejecía.

Entre los 5 y 7 días de establecidos los microcultivos, los extremos de las hifas del micelio empezaron a concentrar el contenido citoplasmático tornándose de aspecto granuloso e iniciaron la formación de espirales que luego se ensancharon y aplanaron para luego originar los apresorios al cabo de 48 a 72 h. Los

apresorios inicialmente se observaron hialinos y después de 24 a 72 h de formados se tornaron de color castaño a castaño-oscuro (Figura 4).

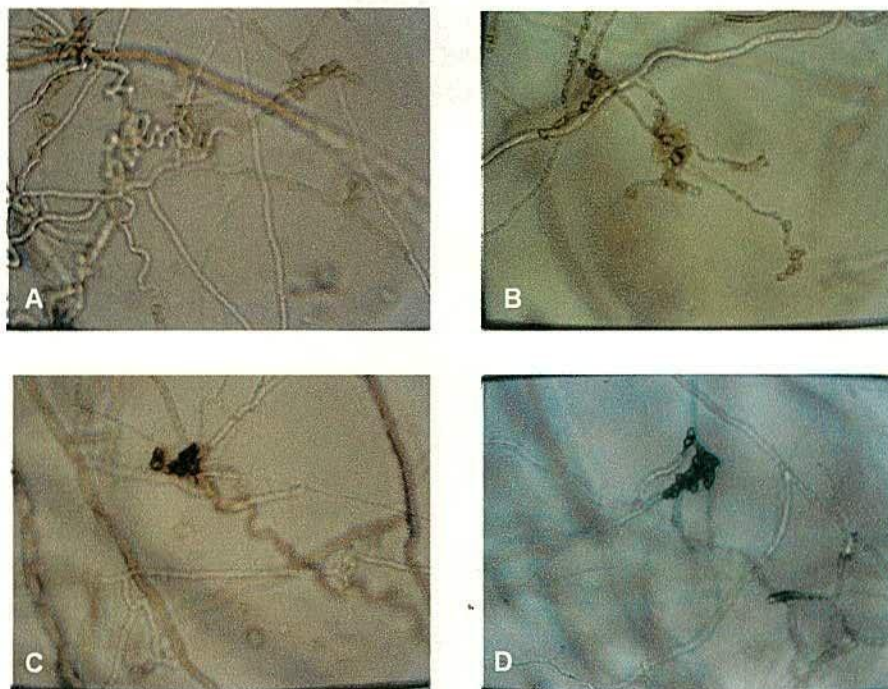


Figura 4. Formación de apresorios. **A.** Hifas espiraladas 40x. **B.** Inicio de la formación de los apresorios 40x. **C.** Apresorios maduros 40x. **D.** Producción de hifas a partir del apresorio 40x.

Entre los 4 y 7 días se observó la formación de unas estructuras redondeadas, hialinas, de aspecto granuloso en su interior, similares a vesículas ubicadas en los terminales de las hifas y algunas en posición intercalar en el micelio. Estas estructuras conservaron su forma por cerca de 24 a 36 h, al cabo de las cuales empezaron a tornarse de color amarillo, a perder su forma y consistencia dando apariencia de deshidratación (Figura 5).

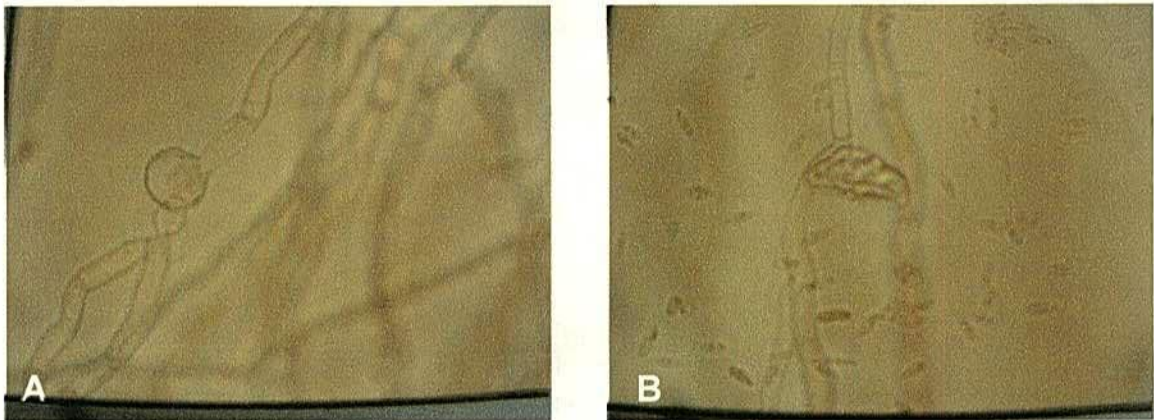


Figura 5. Estructuras similares a vesículas 40x. **A.** Estructura observada a las 126 h, **B.** Estructura perdiendo su forma y consistencia, observada a las 150 h.

En los microcultivos se observaron dos grupos de hifas: uno de éstos, iba colonizando el medio de cultivo extendiéndose a través de él para formar conidióforos simples y apresorios, el otro grupo de hifas, más cortas (abundantes en los aislamientos con mayor aptitud para esporulación) se especializaban en producir masivamente conidias. La mayor esporulación y la formación de acérvulos ocurrieron principalmente en los bordes de las laminillas donde se agota el medio de cultivo y el hongo entra en contacto con el aire.

Tasa de crecimiento. La mayor tasa de crecimiento la presentó el tratamiento AEPT-3, con 0.318 cm/día y la menor tasa el aislamiento AMSEM-2, con 0.114 cm/día (Tabla 6). En el análisis de varianza se registró una diferencia altamente significativa entre los diferentes aislamientos. Al aplicar la prueba de Duncan al nivel del 5% se conformaron siete grupos ampliamente traslapados (Anexo 6).

Al observar detenidamente los valores de las tasas de crecimiento podemos sugerir los siguientes rangos en dichas tasas: un primer grupo, conformado por las tasas mas altas que van desde 0.318cm/día hasta 0.292cm/día; un segundo

grupo, de tasas altas que van desde 0.287cm/día hasta 0.269 cm/día; un tercer grupo, de tasas medias que va desde 0.266cm/día hasta 0.241 cm/día; un cuarto grupo, con tasas bajas que van desde 0.238 cm/día a 0.173 cm/día; y un quinto grupo, con las tasas más bajas, que van desde 0.161cm/día a 0.114 cm/día (Anexo 6). Estas tasas de crecimiento se obtuvieron a 17°C, y no concuerdan con las tasas de crecimiento reportadas por Adaskaveg y Hartin (1997), para aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* mantenidos a 25°C y 30°C, respectivamente, para separar las especies. En nuestro estudio las tasas de crecimiento fueron inferiores a las registradas por estos investigadores. Sin embargo, Freeman, Katan y Shabi, (1998), encontraron tasas de crecimiento de *C. gloeosporioides* con crecimiento tan lento que no difirió de las tasas de crecimiento de *C. acutatum*.

En la Tabla 6, se registran los colores predominantes en los aislamientos estudiados mediante comparación con la carta de color "RSH Colour Chart" (The Royal Horticultural Society ,1966), usada para la descripción de colores en trabajos de caracterización de germoplasma vegetal. En general, un 36% de éstos aislamientos presentaron una coloración gris-naranja, un 24% amarillo-naranja, un 12% naranja-blanco, un 9% naranja, un 9% blanco y finalmente un 9% en otras coloraciones.

Tabla 6. Resultados de la caracterización morfológica de los aislamientos.

Código de las cepas	Hospedante	Patogenicidad	Color de la cepa	Aspecto del micelio	Tasa de crecimiento (cm/día)	Dimensiones de las conidias largo-ancho(μ)	Forma de las conidias	Observaciones
ASRTT-1	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 165 B,C,D con anillos orange white 159 A,B,C,D.	Ralo superficial	0.2161	11.9 x 4.9	Principalmente ovoides, elipsoides, algunas ligeramente fusiformes.	Esporulación abundante.
ASRMT-1	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 164 C,D con anillos orange 29D, greyed orange 165 A, 170 C, 177 B.	Ralo superficial	0.2853	10.4 x 5.0	Ovoides, elipsoides, fusiformes con ligera constricción en el centro.	Esporulación abundante. A las 96 horas se observó estructuras parecidas a vesículas.
ASRBT-1	Tomate	Positiva	Fondo orange white 159 entre C,D. Centro de la colonia greyed orange 165 C.	Ralo superficial	0.2662	11.3 x 4.7	Oblongas, elipsoides, ligeramente fusiformes	Esporulación abundante.
ASRBT-2	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 173 D con anillos greyed brown 199 A,C,D.	Ralo superficial	0.2786	10.7 x 4.5	Oblongas, ovoides, elipsoides, ligeramente fusiformes.	Esporulación abundante.
ASROT-1	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 165 C,D con semicírculos greyed orange 165 B y centro orange 173 C,D.	Ralo superficial	0.2921	10.6 x 5.0	Ovoides, elipsoides con ligera constricción central.	Esporulación abundante.

Continuación Tabla 6

Código de las cepas	Hospedante	Patogenicidad	Color de la cepa	Aspecto del micelio	Tasa de crecimiento (cm/día)	Dimensiones de las conidias largo-ancho(μ)	Forma de las conidias	Observaciones
ASROT-2	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 165 C,D con anillos Brown 200 C,D, greyed green, 197 A,B-D. Centro de la colonia yellow orange 19 B,C,D.	Denso superficial.	0.3017	10.7 x 5.0	Elipsoides, ovoides.	Abundante esporulación.
ASRLmT-1	Tomate	Positiva	Fondo orange white 159 A,B,C,D con anillos greyed orange 166 C,D. Greyed orange 173 C,D. Greyed green 197C.	Ralo algodonoso.	0.2079	9.7 x 5.0	Ligeramente fusiformes.	Abundante esporulación en el centro de la cepa. Forma estructuras parecidas a vesículas a las 96 horas.
ASRLmT-2	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 165 C,D con área central greyed orange 165 A,B. La cepa presenta anillos Brown 200 A,B, grey 201 y grey-brown 199 A, D.	Ralo con agregados miceliares (aspecto grumoso).	0.1830	9.9 x 5.0	Ligeramente fusiformes.	Abundante esporulación. A las 96 horas forma estructuras parecidas a vesicululas.
ASRLmT-3	Tomate	Negativa	Fondo orange 27 A,B,C,D con semicírculos greyed orange 165 A,B y área central orange 24 D.	Ralo superficial	0.3013	11.9 x 4.7	Elípticas, ligeramente fusiformes.	Buena esporulación. A las 168 horas forma estructuras parecidas a vesículas.

Continuación Tabla 6

Código de las cepas	Hospedante	Patogenicidad	Color de la cepa	Aspecto del micelio	Tasa de crecimiento (cm/día)	Dimensiones de las conidias largo-ancho(μ)	Forma de las conidias	Observaciones
AEPT-1	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 165 D, con anillos greyed orange 165 A,B,C conformados por los acérvulos.	Ralo con agregados miceliares (aspecto grumoso).	0.2556	8.7 x 5.0	Fusiformes, elipsoides.	Abundante esporulación. A las 168 horas forma estructuras parecidas a vesículas, que empiezan a colapsarse después de las 200 horas.
AEPT-2	Tomate	Positiva	Fondo yellow orange 19 C,D con acérvulos greyed orange 164 A,B distribuidos irregularmente en la zona central de la cepa.	Ralo superficial	0.3113	11.6 x 4.7	Ligeramente fusiformes, algunas ovoides y oblongas.	Buena esporulación.
AEPT-3	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 27 A,B,C,D con centro orange 26 y acérvulos negros, distribuidos de manera irregular en toda la cepa.	Ralo superficial	0.3185	10.8 x 4.6	Ovoides, ligeramente fusiformes.	Buena esporulación.
AECeT-1	Tomate	Positiva	Fondo orange 26 C,D con acérvulos formando círculos de color greyed orange 165 B,C,D.	Ralo superficial	0.3058	11.6 x 4.5	Elipsoides, ligeramente fusiformes.	Abundante esporulación.

Continuación Tabla 6

Código de las cepas	Hospedante	Patogenicidad	Color de la cepa	Aspecto del micelio	Tasa de crecimiento (cm/día)	Dimensiones de las conidias largo-ancho(μ)	Forma de las conidias	Observaciones
AETT-1	Tomate	Positiva	Fondo yellow orange 20 C,D con acérvulos pequeños distribuidos formando anillos de color greyed orange 166 C,D.	Ralo superficial con agregados miceliares (grumoso).	0.3119	10.5 x 5.0	Fusiforme, elipsoide y algunas ovoides.	Poca esporulación.
AETT-2	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 26 C,D, con zona central orange 26. La cepa presentó numerosos acérvulos conformando semicírculos de color greyed orange 164 A.	Ralo superficial	0.3032	10.6 x 4.2	Elipsoides y algunas fusiformes.	Abundante esporulación.
ARLLT-1	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 165 C,D, presentó formación de un gran círculo de color greyed orange 165 en el centro de la cepa.	Ralo superficial	0.2876	10.2 x 3.7	Elipsoides, ovoides.	Poca esporulación.

Continuación Tabla 6

Código de las cepas	Hospedante	Patogenicidad	Color de la cepa	Aspecto del micelio	Tasa de crecimiento (cm/día)	Dimensiones de las conidias largo-ancho(μ)	Forma de las conidias	Observaciones
ARLLT-3	Tomate	Positiva	Fondo greyed orange 164 A,B,C con acérvulos formando anillos grey brown 199 A,B, brown 200 A,B, orange white 159 A,B.	Ralo superficial	0.1943	9.2 x 4.7	Elipsoides, algunas fusiformes.	Abundante esporulación. Formación de estructuras parecidas a vesículas a las 144 horas. Estas estructuras empiezan a colapsarse a las 240 horas.
AGScM-1	Mora	Positiva	Fondo yellow orange 19 con anillos concéntricos formados por acérvulos orange 25 A,B.	Ralo superficial con pequeños agregados miceliares (grumos).	0.3137	14.9 x 4.6	Elipsoides, fusiformes y algunas ovoides.	Buena esporulación,
AMSEM-1	Mora	Positiva	Fondo orange 19 B,C,D con acérvulos agregados (formando manchones) con esporulación orange 25 A,B. En el centro presenta semicírculos brown 20 A,B.	Denso con algunos agregados miceliares (grumos).	0.2017	12.8 x 5.0	Elipsoides, fusiformes, ovoides.	Buena esporulación.

Continuación Tabla 6

Código de las cepas	Hospedante	Patogenicidad	Color de la cepa	Aspecto del micelio	Tasa de crecimiento (cm/día)	Dimensiones de las conidias largo-ancho(μ)	Forma de las conidias	Observaciones
AMSEM-2	Mora	Continuación Tabla 6 Positiva	Fondo white 155 D,C con acérvulos formando anillos orange 29 A en la zona central de la cepa.	Ralo con algunos agregados miceliares (grumos).	0.1141	12.3 x 5.0	Fusiformes, ovoides.	Poca esporulación. Forma estructuras parecidas a vesículas a las 178 horas.
AMSEM-5	Mora	Negativa	Fondo white 155 C, D con anillos formados por acérvulos orange 25 C.	Ralo con agregados miceliares compactos (grumos).	0.1617	13.4 x 4.8	Elipsoides, ligeramente fusiformes.	Buena esporulación.
AMSEM-6	Mora	M 6 Positiva	Fondo yellow orange 19 B,C,D Con pigmentaciones irregulares de color Negro distribuidas en la cepa. La zona del centro yellow orange 20 C,D.	Ralo con agregados miceliares compactos (grumos).	0.2785	15.1 x 4.9	Elipsoides, ligeramente fusiformes.	Abundante esporulación.
CMTT-1	Tomate	Positiva	Fondo yellow orange 19 B,C,D con acérvulos formando anillos irregulares de color greyed orange 166 B,C,D.	Ralo superficial con agregados miceliares (grumos).	0.1731	10.9 x 4.4	Elipsoides, ovoides, algunas levemente fusiformes costrictas.	Buena esporulación.

Continuación Tabla 6

Código de las cepas	Hospedante	Patogenicidad	Color de la cepa	Aspecto del micelio	Tasa de crecimiento (cm/día)	Dimensiones de las conidias largo-ancho(μ)	Forma de las conidias	Observaciones
CMTUT-1	Tomate	Positiva	Fondo yellow orange 19 B,C con acérvulos greyed orange 165 B,C conformando agregados irregulares.	Ralo superficial	0.2386	10.4 x 4.2	Elipsoides, ligeramente fusiformes, algunas ovoides, claviformes.	Abundante esporulación.
CMchMa-1	Manzano	Positiva	Fondo orange white 159 A,B,C,D con acérvulos negros distribuidos en toda la cepa. En el centro se aprecia color orange white 159 B,C,D.	Ralo con agregados miceliares (grumos).	0.2695	11.8 x 4.3	Ovoides, elipsoides.	Buena esporulación.
CVMVMa-1	Manzano	Positiva	Fondo white 155 D con acérvulos negros distribuidos irregularmente en la cepa. En el centro predomina el color yellow orange 19 C,D.	Ralo con pocos y pequeños agregados de micelio denso (grumos) distribuidos en toda la cepa.	0.2414	9.3 x 4.1	Elipsoides algunas ligeramente fusiformes.	Buena esporulación.

Continuación Tabla 6

Código de las cepas	Hospedante	Patogenicidad	Color de la cepa	Aspecto del micelio	Tasa de crecimiento (cm/día)	Dimensiones de las conidias largo-ancho(μ)	Forma de las conidias	Observaciones
CVMLfMa-1	Manzano	Negativa	Fondo greyed orange 165 D con anillos de color greyed orange 169 D, la zona del centro es de color greyed green 198 B,C,D.	Ralo superficial con agregados miceliares (grumos) formando anillos en la cepa.	0.1415	12.8 x 4.7	Elipsoides, ovoides.	Abundante esporulación.
CVMLfMa-3	Manzano	Positiva	Fondo yellow white 159 A,B con acérvulos agregados de color brown 200 A,B,C en el centro de la cepa predomina el color orange white 159 A,B,C,D.	Denso, grumoso, algodonoso compacto.	0.1295	11.5 x 4.3	Elipsoides, algunas ovoides.	Buena esporulación.
CVMLfMa-4	Manzano	Positiva	Fondo orange white 159 A,B,C,D con zona central orange white 159 A,B. Acérvulos greyed orange 165 A,B y brown 200 A distribuidos en el centro de la cepa.	Ralo superficial con agregados miceliares (grumos) en forma de anillos en la cepa.	0.1885	11.1 x 4.4	Elipsoides, ovoides.	Abundante esporulación.

Continuación Tabla 6

Código de las cepas	Hospedante	Patogenicidad	Color de la cepa	Aspecto del micelio	Tasa de crecimiento (cm/día)	Dimensiones de las conidias largo-ancho(μ)	Forma de las conidias	Observaciones
CRSEoMa-1	Manzano	Positiva	Fondo yellow orange 20 C,D con acérvulos negros distribuidos en la cepa. La zona del centro de la cepa presenta color yellow orange 23 C.	Ralo superficial	0.1578	14.6 x 4.9	Elipsoides.	Buena esporulación.
CRSEoMa-2	Manzano	Positiva	Fondo yellow orange 19 B,C con acérvulos negros y orange 25 A,B, formando anillos concentrados hacia el centro de la cepa.	Ralo superficial	0.2103	11.4 x 4.8	Elipsoides algunas ovoides.	Buena esporulación.
E393	Tomate	Cepa C-52 de Referencia CORPOICA	Greyed green 198 B,C, con acérvulos distribuidos en toda la cepa formando anillos.	Ralo superficial	0.1793	8.8 x 3.5	Ovoides, algunas ligeramente constrictas	Buena esporulación.
Accesión 184 CIAT	<i>Stylosanthes</i>	Cepa patrón de Referencia	Brown 200 A,B, grey 201 y grey-brown 199 con acervulos negros distribuidos en la cepa.	Ralo superficial	0.2843	12.2 x 5.0	Ovoides, elipsoides algunas ligeramente constrictas.	Buena esporulación.

OBSERVACIONES: Transcurridos 6 días en los microcultivos se observaron cambios en la morfología de las conidias (ensanchamientos que aumentaron su tamaño hasta en un 100%). El micelio también empezó a presentar cambios después de 7 días, caracterizados por ensanchamientos, translocación del contenido citoplasmático de la zona mas vieja hacia los puntos de crecimiento, las hifas empezaron a tornarse de aspecto granuloso (en su contenido citoplasmático) se fueron aplanando y entorchando (en forma de espirales) para iniciar la formación de los apresorios, los cuales inicialmente se presentaron hialinos y luego se fueron tornando de color café de diferentes tonos de color café lo cual ocurrió alrededor de los 10 días.

En ninguno de los aislamientos (cepas) se observó presencia de clamidosporas, setas, esclerocios.

El estado telemorfo tampoco se observó en los cultivos *in vitro* ni en el hospedante inoculado.

Tamaño de las conidias. En la Tabla 6, se presentan los valores en micras (μ) de largo y ancho de las conidias de los diferentes aislamientos del hongo. El largo de las conidias fluctuó entre 8.73μ y 15.17μ . Se registraron diferencias altamente significativas para la variable largo de conidias. Con la aplicación de la prueba de Duncan a nivel del 5%, se obtuvieron 18 grupos para esta variable, el mayor de ellos conformado por 15 aislamientos y el menor con un solo aislamiento. Entre los valores de largo de conidias comprendidos entre 10.6μ - 11.93μ , se concentra un traslape de casi todos los aislamientos, lo cual dificulta la separación o diferenciación de estos mediante la utilización de esta variable en este rango. El ancho de las conidias fluctuó entre 3.52μ y 5.09μ , presentando diferencias altamente significativas. Al aplicar la prueba de Duncan a nivel de 5%, se conformaron 16 grupos, con un menor número de aislamientos por grupo respecto a lo encontrado con la variable largo de conidias. Los grupos se presentan ampliamente traslapados, lo cual dificulta aun mas la diferenciación de los aislamientos utilizando la variable ancho de conidias (Anexo 7).

Forma de las conidias. Se presentaron diversas formas de conidias tanto entre las diferentes cepas como dentro de una misma cepa. Las principales formas encontradas, considerando las definiciones de Ulloa y Hanlin (2000), para los tipos de conidias fueron: elipsoides, ligeramente fusiformes, ovoides, oblongas y elipsoides ligeramente constrictas (Tabla 6, Figura 6).

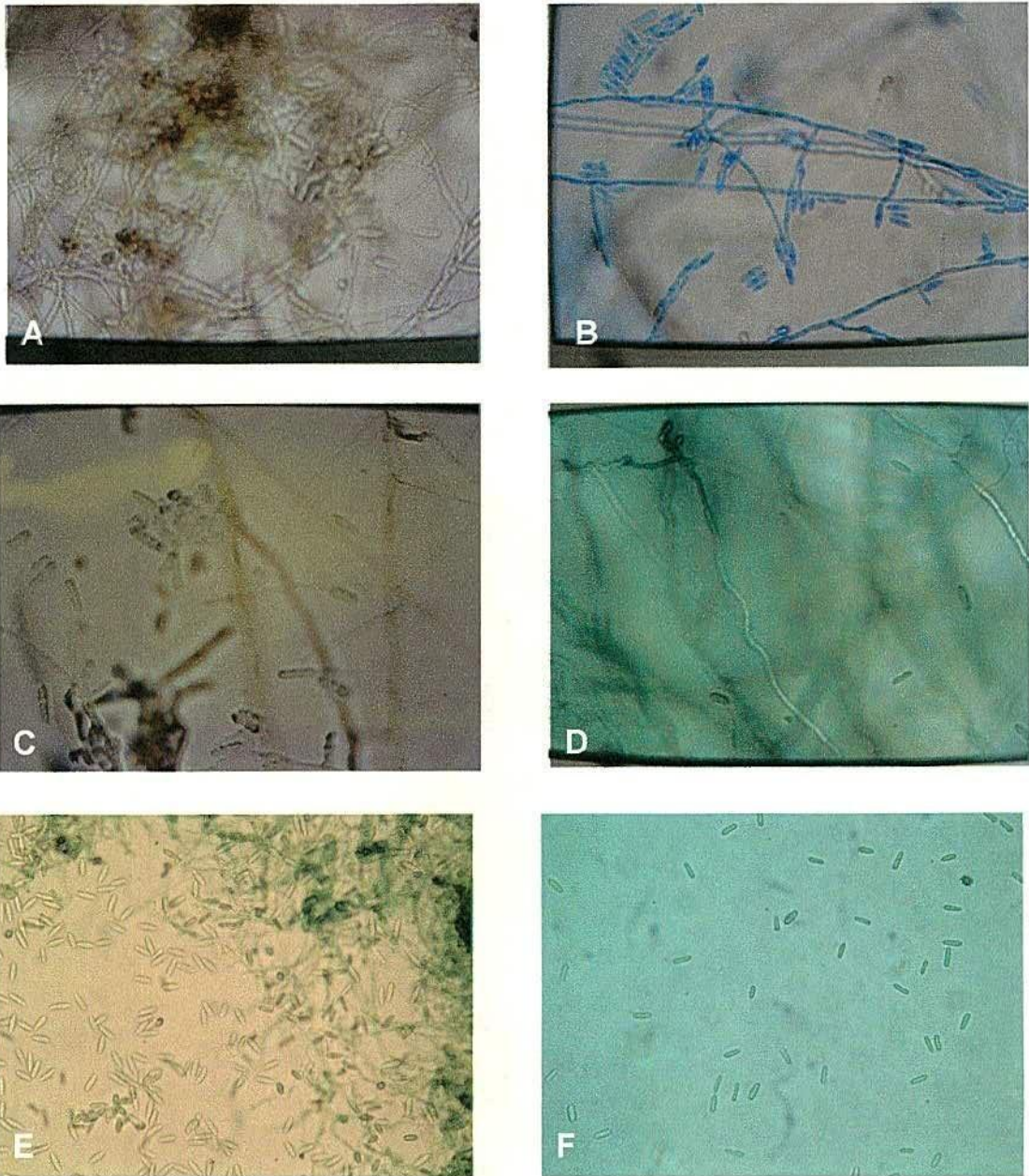


Figura 6. Morfología de las conidias 40X. **A.** Cepa AGScM-1, **B.** Cepa AETT-1, **C.** Cepa AGLcM-1, **D.** Cepa ASRTT-1, **E.** Cepa AMSEM-5, **F.** Cepa 393.

Según Freeman, Katan y Shabi (1998) y Sutton (1992), la morfología de las conidias, así como tamaño de las mismas no son satisfactorios para distinguir las especies de *Colletotricum*, dado que la estabilidad de los rasgos morfológicos es afectada por factores ambientales, además de la existencia de formas intermedias en la morfología conidial y en el tamaño, lo cual conlleva a que la cepa pueda ser identificada como una u otra especie dependiendo de los criterios individuales del identificador. La plasticidad morfológica y la superposición fenotípica, hacen difícil la clasificación y complicado el empleo del criterio clásico para la identificación de las especies de este género (Martínez-Culebras *et al.*, 2000).

Según Wharton y Diéguez (2004), el tamaño de las conidias esta influenciado por el medio de cultivo; y respecto a la forma ocurren casos como el de la fresa, en el que ocasionalmente las conidias de *C. acutatum* tienen los extremos menos puntiagudos y mas redondeados tendiendo a parecerse a las de *C. gloeosporioides* (OEPP/EPPO, 2004), igualmente sucede en el caso de la Antracnosis de los cítricos en la que se presentan conidias atípicas de *C. acutatum* que también se confunden en su morfología con las de *C. gloeosporioides* (Brown, Sreenivasaprasad y Timmer (1996).

Además de lo anterior la falta de estandarización de los protocolos y condiciones de trabajo entre diferentes investigadores, así como la inexistencia de convenciones internacionalmente aceptadas, crean controversias y confusiones que dificultan y producen incertidumbre en las identificaciones (Sutton, 1992).

7.3 TERCERA ETAPA: REALIZACIÓN DE LOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES MEDIANTE PCR Y USO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS.

7.3.1 Crecimiento del hongo: Los aislamientos monospóricos del hongo requeridos para esta etapa se seleccionaron e incrementaron de acuerdo con lo planeado en la metodología. Se cultivaron 27 cepas de *Colletotrichum* procedentes de las diferentes localidades, de las cuales 13 provenían de frutos de tomate de árbol, 7 de frutos de manzano y 5 de tallos de mora. Igualmente se incluyeron dos aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*, usados como controles positivos en los diagnósticos moleculares.

En el medio de cultivo y en las condiciones descritas en la metodología se logró el crecimiento del hongo puro, y al cabo de 11 a 15 días, fue colectado. De los aislamientos seleccionados inicialmente hubo necesidad de descartar 7 cepas por presentar células bacteriales. Las cepas incrementadas para el diagnóstico molecular se relacionan en la Tabla 7.

Tabla 7. Aislamientos seleccionados para diagnóstico molecular.

Codigo	Departamento	Municipio	Localidad	Hospedante	Patogenicidad
ASRTT-1	Antioquia	Santa Rosa	Teresitas	Tomate	Positivo
ASRMT-1	Antioquia	Santa Rosa	Malambo	Tomate	Positivo
ASRBT-1	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	Tomate	Positivo
ASRBT-2	Antioquia	Santa Rosa	Balcones	Tomate	Positivo
ASROT-1	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	Tomate	Positivo
ASROT-2	Antioquia	Santa Rosa	Orobajo	Tomate	Positivo
ASRLmT-2	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	Tomate	Positivo
ASRLmT-3	Antioquia	Santa Rosa	La Muñoz	Tomate	Negativo
AEPT-1	Antioquia	Entrerrios	Pio XII	Tomate	Positivo
AECeT-1	Antioquia	Entrerrios	Cuatroesquinas	Tomate	Positivo
AETT-2	Antioquia	Entrerrios	Tesorero	Tomate	Positivo
AGScM-1	Antioquia	Guarne	Santa Clara	Mora	Positivo
AMSEM-1	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	Positivo
AMSEM-2	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	Positivo
AMSEM-5	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	Negativo
AMSEM-6	Antioquia	Medellín	Santa Elena	Mora	Positivo
CMTT-1	Caldas	Manizales	Tesorito	Tomate	Positivo
CMChMa-1	Caldas	Manizales	Chulca	Manzano	Positivo
CVMVMa-1	Caldas	Villamaría	Valles	Manzano	Positivo
CVMLfMa-1	Caldas	Villamaría	La Florida	Manzano	Negativo
CVMLfMa-3	Caldas	Villa Maria	La Florida	Manzano	Positivo
CVMLfMa-4	Caldas	Villa Maria	La Florida	Manzano	Positivo
CRSEoMa-1	Caldas	Rio Sucio	El Oro	Manzano	Positivo
CRSEoMa-2	Caldas	Rio Sucio	El Oro	Manzano	Positivo
ALCFT	Antioquia	La Ceja	Fátima (z.u)	Tomate	Positivo
E393	Cundinamarca	Cepa C-52 de Referencia CORPOICA		Tomate	Positivo
Accesión 184	Caquetá	Cepa de Referencia CIAT		<i>Stylosanthes</i>	Positivo

7.3.2 Extracción y cuantificación del ADN. El procedimiento de extracción del ADN se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Reader y Broda (1985), con las modificaciones ajustadas en el laboratorio de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB, y descritas en la metodología. Con este método ajustado se obtuvieron rendimientos entre 300 y 17.750 ng/ μ L de ADN, concentraciones que variaron según el aislamientos del hongo. A partir de estas concentraciones se

realizaron las diluciones a 100 ng/ μ L en cada una de las muestras de ADN de los aislamientos.

7.3.3 PCR diagn3stica. La diferenciación de las especies de *Colletotrichum* basada en los caracteres morfol3gicos de las cepas y conidias, así como en la patogenicidad de las especies, origen y especificidad del hospedante, tasa de crecimiento miceliar y presencia del telemorfo, entre otros, son poco satisfactorios y presentan limitaciones para la identificación específica (Wharton y Diéguez, 2004; OEPP/EPPO, 2004; Vinnere, 2004; Romero, 1999; Freeman, Katan y Shabi 1998; Brown, Sreenivasaprasad y Timmer, 1996; Mills, Hodson y Brown, 1992; Sutton, 1992; Lour, Geiger y Goujon, 1979), siendo difícil la caracterización de aislamientos específicos a un hospedante y aun más crítica la diferenciación de aislamientos procedentes de diferentes hospedantes (Kaufmann y Weidemann, 1996). Ante esta situación las herramientas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) han venido ganando popularidad en la aplicación para el diagnóstico y la diferenciación entre las especies del hongo (Freeman, Katan y Shabi 1998; Adaskaveg y Hartin 1997; Brown, Sreenivasaprasad y Timmer 1996; Mills *et al.*, 1994).

Vinnere (2004), Freeman, Katan y Shabi (1998), Adaskaveg y Hartin (1997), Brown, Sreenivasaprasad y Timmer (1996), Mills *et al.* (1994) y Sreenivasaprasad *et al.* (1993), desarrollaron oligonucle3tidos específicos (basados en la secuenciación de la regi3n ITS1 del ADN ribosomal de varias especies de *Colletotrichum*) y aplicaron técnicas moleculares que permitieron la identificación y separación de especies del hongo estrechamente relacionadas.

Fundamentados en estos trabajos, y aplicando el protocolo descrito en la metodología se sometieron los ADN de los aislamientos seleccionados a una PCR para diagnóstico específico empleando los oligonucleótidos CgInt-ITS4, lográndose solamente la amplificación de los controles positivos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 7).

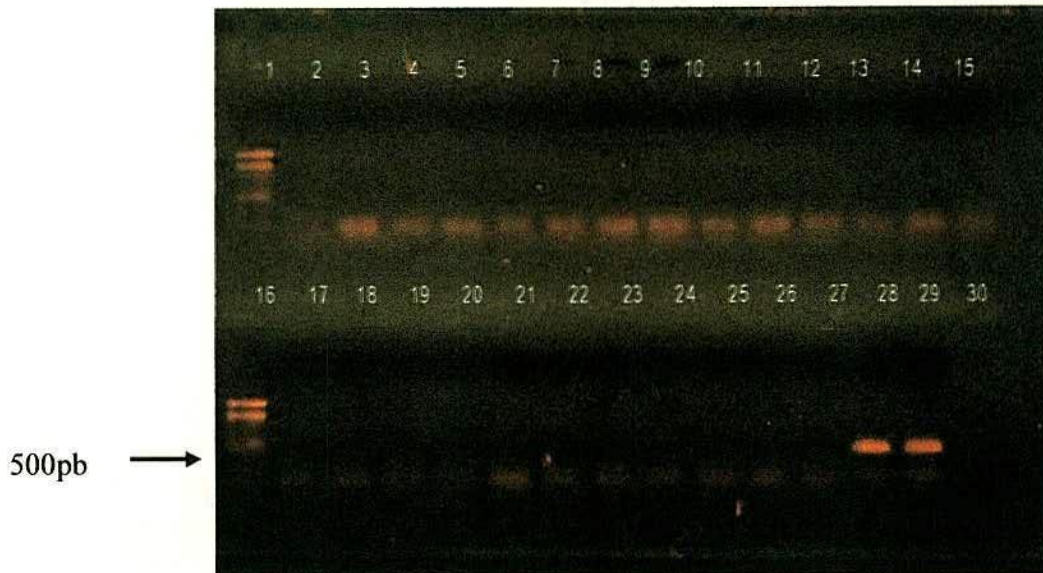


Figura 7. PCR diagnóstica para *C. gloeosporioides*. Productos amplificados con los oligonucleótidos CgInt-ITS4. Carriles 1 y 16. Marcadores de peso molecular 100pb ladder-CIB. Carriles 2-27 ADN de los aislamientos de *Colletotrichum*. Carriles 28 y 29 controles positivos para *C. gloeosporioides*. Carril 30, control negativo para la PCR.

Este resultado sugiere que los aislamientos de *Colletotrichum* provenientes de los cultivos de tomate de árbol, mora y manzano no corresponden a la especie *C. gloeosporioides*; o que las muestras de ADN se han degradado; por lo cual se realizó otra PCR usando esta vez los oligonucleótidos universales ITS1-ITS4; en esta prueba se logró amplificar todos los ADN del cepario, indicando este resultado que los ADN no habían sufrido degradación (Figura 8).

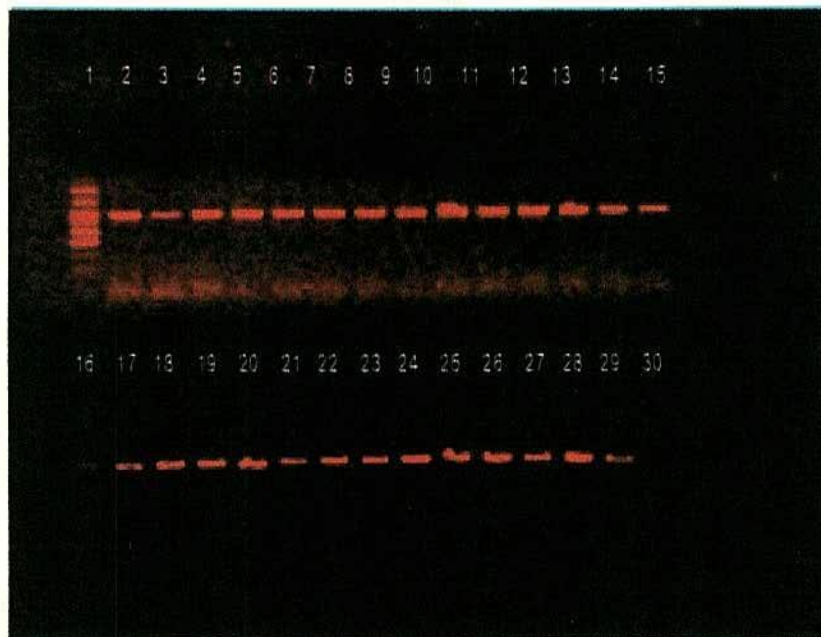


Figura 8. Productos amplificados con los oligonucleotidos ITS1-ITS4. Carril 1. Marcadores de peso molecular 100pb ladder-CIB. Carril 16 blanco. Carriles 2-15,17-29 ADN de los aislamientos de *Colletotrichum*. Carril 30 control negativo para la PCR.

Con estos resultados, y con la revisión de literatura realizada sobre los caracteres morfológicos de las especies de *Colletotrichum*, así como los reportes de especies del hongo patógenas a manzano, tomate de árbol y mora; además de los registros sobre el uso de oligonucleótidos (primer o cebadores) en la diferenciación de especies de *Colletotrichum* en frutales, se solicitó sintetizar para importar el oligonucleotido Calnt-2 referenciado en los trabajos de Adaskaveg y Hartin (1997), como específico y útil para el diagnóstico de *Colletotrichum acutatum* en fresa, almendro y durazno. Con este oligonucleótido y aplicando el protocolo descrito en la metodología se sometieron nuevamente los ADN de los aislamientos seleccionados a una PCR diagnóstica empleando esta vez los oligonucleótidos Calnt-2 e ITS4 y una cepa control positivo para *C. acutatum*. En esta PCR se logró la amplificación de todos los ADN de las cepas, incluyendo el control positivo (Figura 9); cuya cepa correspondió al ADN de un aislamiento de *Colletotrichum acutatum* (denominado CA-2, NV-33 referenciado como Cepa 1384 en la colección

de trabajo del C.I. Tibaitata de CORPOICA) proveniente de cáliz persistente de naranja Valencia cultivada en la finca El Pinal en el municipio de Caicedonia – Valle del Cauca.



Figura 9. Productos amplificados con los oligonucleotidos Calnt-ITS4. Carriles1 y16. Marcadores de peso molecular 100pb ladder-CIB. Carriles 2-15, 17-26 ADN de los aislamientos de *Colletorichum*. Carril 27, control negativo para la PCR. Carril 28 control positivo para *C. acutatum*.

C. acutatum es reportado como patógeno causante de Antracnosis en tomate de árbol y en manzano; pero en mora no se encuentran registros de esta especie del hongo causando enfermedad en dicho cultivo.

Tradicionalmente *C. acutatum* era diferenciado de *C. gloeosporioides* principalmente por la forma de las conidias, el color de las cepas, ocurrencia del telemorfo y sensibilidad diferencial a benomil; sin embargo, después del año 2004 se publicaron una serie de trabajos de investigación adelantados por Wharton y Diéguez (2004), OEPP/EPPO (2004), Vinnere (2004), Vinnere *et al.* (s.f) y Vinnere (investigación I y IV, manuscrito sin publicar) en los que estos aspectos son reevaluados (Anexo 8). Los mencionados trabajos referencian a *C. acutatum* como

una especie poseedora de una amplia diversidad genética y una gran variabilidad en sus caracteres morfológicos y fisiológicos.

El Anexo 8, es un documento en el que se consigna una revisión de literatura actualizada que permite conocer los principales aspectos biológicos y taxonómicos de *C. acutatum* como también las propuestas actuales relacionadas con los grupos biológicos, su reubicación taxonómica y lo que podría ser una definición de especies aplicable al género.

La presencia de *C. acutatum* en estos frutales crea la necesidad de adelantar nuevos estudios para conocer el comportamiento del patógeno y su contribución a las pérdidas ya registradas por la Antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en los frutales de clima frío; igualmente hace necesario investigar sobre la composición poblacional de *Colletotrichum*, prevalencia de las especies, fuentes de inóculo y ciclos de la enfermedad bajo condiciones del trópico, entre otros aspectos.

8. CONCLUSIONES

Mediante la aplicación de la PCR en el diagnóstico de patógenos vegetales se pudo detectar la presencia de *Colletotrichum acutatum* causando Antracnosis en frutos de tomate de árbol y manzano, como también causando lesiones y muerte en ramas de mora.

En este trabajo de investigación se comprobó la gran variabilidad existente en los caracteres morfológicos de los aislamientos de *Colletotrichum acutatum* provenientes de frutos de tomate de árbol, manzano y tallos de mora de los departamentos de Antioquia y Caldas, así como la dificultad para diferenciar las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* mediante dichos caracteres.

Existe variabilidad dentro y entre los aislamientos en lo referente a las características morfológicas de las cepas, especialmente en el color, y en el aspecto y tipo del micelio; lo cual hace que estos caracteres no sean confiables para la diferenciación de las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* debido a que se traslapan.

La morfología conidial (tamaño y forma), tradicionalmente empleada para el diagnóstico e identificación de las especies del género, presentó variaciones entre y dentro de los aislamientos, dificultando el establecimiento de patrones de diferenciación entre los aislamientos; además de la inestabilidad de los rasgos fenotípicos durante el transcurso del tiempo, en el que las cepas obtenidas de los diferentes hospedantes y los controles se encontraban en crecimiento y desarrollo.

Las aplicaciones de la PCR en el diagnóstico de las especies de *Colletotrichum* ofrecen una herramienta valiosa que complementa los trabajos clásicos de morfología y da confiabilidad y/o sirve de complemento en la identificación y reconocimiento de las especies del género.

Los protocolos de diagnóstico molecular desarrollados y empleados durante la ejecución de este trabajo permitieron diferenciar las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* aisladas de tomate de árbol, manzano y mora y son un aporte valioso para continuar los estudios sobre el complejo *Colletotrichum* en los frutales de clima frío moderado.

9. RECOMENDACIONES

En las especies de frutales que sufren los efectos perjudiciales de la Antracnosis se deben realizar los estudios básicos tendientes a conocer la composición poblacional de *Colletotrichum* teniendo presente el empleo o desarrollo de sistemas de muestreo balanceados y protocolos que permitan acceder a la mayor información posible en términos de la variabilidad y/o diversidad biológica del hongo en los diferentes sistemas de producción.

Aprovechando los avances en las comunicaciones se debe fomentar el desarrollo de metodologías, sistemas de trabajo o protocolos que se puedan estandarizar y socializar a un amplio grupo de investigadores con el propósito de que estos sean aplicados en sus investigaciones, y de esta forma contribuir para que los resultados obtenidos en diferentes partes del mundo, puedan ser mas fácilmente comparados e interpretados, lo cual puede redundar en el avance de la ciencia y el conocimiento.

BIBLIOGRAFÍA

ADASKAVEG, J. E. and HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. En: Phytopathology 87(1997); p. 979-987.

AFANADOR, L.; MINZ, D.; MAYMON, M. and FREEMAN S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. En: Ecology and Population Biology. Vol. 93, Nº 5 (2003); p. 579-587.

AFANADOR, L.; RENDÓN, M. y HOYOS R.A. Estudios preliminares para la identificación y caracterización de especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a la Antracnosis en tomate de árbol. En : CONGRESO ASCOLFI (2000 : Palmira). Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Palmira : Ascolfi, 2000. p. 22.

AGOSTINI, P.J.; TIMMER, L.W. and MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. En: Phytopathology 82(1992); p. 1377-1382. Citado por: BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S. and TIMMER, L. Phytopathology 86(1996); p. 523-527.

AGRIOS, N., G. Fitopatología. México : Limusa, 1991. p. 324- 337, 726.

ALEXOPOULUS, C. Introducción a la micología. Buenos Aires : Eudeba, 1962. p. 319, 412.

ALVAREZ, J.M. y ARANZAZU, F. Manejo integrado de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en tomate de árbol (*Solanum betacea* Cav. Sendt.) en el municipio de Manizales. En : CONGRESO ASCOLFI (1999 : Manizales). Memorias del XX Congreso Nacional de Fitopatología. Manizales : Ascolfi, 1999. p.77.

ANJOS, J.; CHARCHAR, M. y AKIMOTO, A. Ocorrência de Antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* em pequiheiro no Distrito Federal. En: Fitopatología Brasileira 27 (2002); p. 96-98.

ANÓNIMO. La caña de azúcar. Enemigos de la caña de azúcar. Sociedad de Agricultores de Colombia. En: Rev. Nal de Agricultura. 9 (1913); p. 101-102. Citado por: CASTAÑO, José Joaquín. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571- 1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

ARANZAZU, F. Variación estacional de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en tomate de árbol (*Solanum betacea*). En : CONGRESO ASCOLFI (1999 : Manizales). Memorias del XX Congreso Nacional de Fitopatología. Manizales : Ascolfi, 1999. p. 54.

ARANZAZU, F.; ALVAREZ, J.M. y ZULUAGA, L.E. Manejo integrado de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en tomate de árbol (*Solanum batatea* Cav. Sendt.) en el municipio de Manizales. En : SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRÍO MODERADO (1998 : Manizales). Memorias del Segundo Seminario Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales : Corpoica-Regional 9, p. 10.

ARANZAZU, F. y CHIQUITO, C. Períodos de incubación de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en frutos de tomate de árbol de diferente edad. En : SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRÍO MODERADO (1998 : Manizales). Memorias del Segundo Seminario Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales : Corpoica-Regional 9, 1998. p. 16-19.

_____ En: Ascolfi Informa. Vol. 24, N° 5 (1998); p. 24-25.

ARANZAZU, F.; HINCAPIÉ, E. y CASTILLO, L. Antracnosis en tomate de árbol (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) avances en aspectos epidemiológicos. En : SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRÍO MODERADO (1998 : Manizales). Memorias del Segundo Seminario Frutales de clima Frío Moderado. Manizales : Corpoica-Regional 9, 1998. p. 1-8.

ARANZAZU, F. y RONDÓN, G. Manejo productivo del cultivo del tomate de árbol y de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz), Penz. & Sacc.). Santafé de Bogotá : Boletín Divulgativo CORPOICA-PRONATTA, 1999. p. 9-18.

ARCHILA, A.; CARDENAS, O.; PÁEZ, N. y HUNG, G. Introducción a la metodología de diagnóstico fitopatológico y nematológico. Maracay : Ministerio de Agricultura y Cría U.E.D.A. Departamento de Sanidad Vegetal, laboratorio de diagnóstico y control fitosanitario. 1991. p. 28, 31-34, 49-56.

ARX, J.A. Von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. *Phytopathologische Zeitschrift* 29 (1957); p 413-468. Citado por: MILLS, P.R.; HODSON, A. and BROWN, A. E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. En : BAILEY, J.A. and JEGER, M.J.(Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK : CAB International, 1992. p 269-287.

_____. *Phytopathologische Z.* 29 (1957a); p. 413-468. Citado por: GUNNELL and DOUGLAS. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. En: *Mycologia*. Vol. 84, N° 2 (1992); p. 157-165.

_____. *Phytopathologische Zeitschrift* 29(1957a); p. 413-468. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* En : BAILEY, J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK : CAB International, 1992. p. 1-26.

_____. The genera of fungi sporulating in pure culture. 3rd edn. J. Cramer, Vaduz, 1981. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* En : BAILEY, J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

_____. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten Pilze. *Vehandelingen. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Afd. Natuurkunde Sect.II*, 51(1957b); p. 1-153. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* En : BAILEY, J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

ARX, J.A. and MÜLLER, E. Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. *Beitr. Krypt. Schw.* 11 (1954.); p 1-434. Citado por: SUTTON, B.C. *The Coelomycetes : Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Kew, London : Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

ÁVILA, W.; GONZÁLEZ, R.; F. DE LA ROTTA, M.C. y VARGAS, A. Penetración, infección y sitios de ataque del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en plantas de mora de castilla. En: CONGRESO ASCOLFI (2003 : Armenia). Memorias del XXIV Congreso Nacional de Fitopatología. Armenia : Ascolfi, 2003. p. 4.

BAILEY, J. A. and JEGER, M. J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. xi-10.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J. and NASH, C. Infection strategies of *Colletotricum* species. En: BAILEY, J.A. and JEGER, M.J.(Eds.). *Colletotrichum : Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK : CAB International, 1992. p 88-119.

BARNETT, H. L. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 2ª ed. Minneapolis : Burgess Publishing Company, 1960. p. 194.

BARTHELEMY, R.; DAWSON, J. y LEE, A. Técnicas para el laboratorio de biología. México : Continental, 1984. p. 62-65.

BAXTER, A., VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A. and EICKER, A. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. En: South African Journal of Botany Vol. 2, Nº 4 (1983); p. 259-289. Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis de grado (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

BAXTER, A. and VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A. A synoptic key to South African isolates of *Colletotrichum*. En: South African Journal of Botany 3 (1984); p. 265-266. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* In : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

BLAKEMAN, J.P. and PARBERY, D.G. Stimulation of appressorium formation in *Colletotrichum acutatum* by phylloplane bacteria. En: Physiological Plant Pathology 11 (1977); p. 313-325.

BLAKEMAN, J.P. and PARBERY, D.G. Stimulation of appressorium formation in *Colletotrichum acutatum* by phylloplane bacteria. En: Physiological Plant Pathology 11 (1977); p. 313-325. Citado por: BOTERO, M.J. Interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., agente causal de la Antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betaceae* (Cav) Sendt). Manizales, Colombia 2001, p. 1-8, 13-18, 20-21, 23, 70, 74, 105, 106. Tesis de grado (programa de Maestría en Fitopatología). Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

BOSSHARD, E. Why is *Colletotrichum acutatum* a quarantine organism, and *C. gloeosporioides* and *C. fragariae* are not?. En: Acta Hor. (ISHS) 439 (1997); p. 799-802.

BOTERO, M.J.; FRANCO, G.; CASTAÑO, J. y RAMÍREZ, M.C. Enfermedades de poscosecha en lulo (*Solanum quitoense*), mora (*Rubus glaucus*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). En : CONGRESO ASCOLFI (2003 : Armenia). Memorias del XXIV Congreso Nacional de Fitopatología. Armenia : Ascolfi, 2003. p.59.

_____. Principales enfermedades en Postcosecha asociadas a cultivos de lulo, manzano, mora y tomate de árbol. Manizales : Universidad de Caldas, Corpoica- Regional 9, Sena Regional Quindío, 1999. p. 23, 55.

BOTERO, M.J; RIOS, G.; FRANCO, G.; ROMERO, M.; PÉREZ, J.C.; MORALES, J.E.; GALLEGOS, J.L. y ECHEVERRI, D.I. Identificación y especialización de enfermedades asociadas a los cultivos de mora (*Rubus glaucus* Benth.), en el eje cafetero. En: SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRÍO MODERADO (2002) : Medellín). Memorias del Cuarto Seminario Nacional Frutales de Clima Frío Moderado. Medellín : Corpoica, Universidad Pontificia Bolivariana y Centro de Desarrollo de Frutales. 2002. p. 87-88.

BOTERO, M. J. Interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., agente causal de la Antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betaceae* (Cav.) Sendt.). Manizales, 2001, p. 1-8, 13-18, 20-21, 23, 70, 74, 105, 106. Tesis de grado (programa de Maestría en Fitopatología). Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S. and TIMMER, L. Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime Anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. En: Phytopathology 86: (1996); 523-527.

BRYSON, R.J.; CATEN, C.E.; HOLLOMON, D.W. and BAILEY, J.A. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. En: BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 27-43.

BURITICA, P. Impacto de las enfermedades de las plantas en Colombia. En: Ascolfi Informa. Vol. 21 N°1 (1995); p. 2-12.

_____. Patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia. Bogotá D C : Produmedios, 1999. 329 p.

CABI / EPPO. Data sheets of quarantine pest. *Colletotrichum acutatum*. Prepared by CABI and EPPO for EU under Contract 90/399003. 1994. 6 p.

CADAVID, M.E.; RIVAS, L.D.; ARIAS, J.H. y RÍOS, E.A. Producción y manejo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) en el Oriente antioqueño. Bello : Corpoica C.I Tulio Ospina, 1994. p. 1-59.

CASTAÑO, J.J. Antracnosis del fruto y de las ramas del café. En: Rev. Cafetera de Colombia. Vol. 10 N°123 (1951); p.3813-3820. Citado por: CASTAÑO, J.J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

CASTAÑO, J.J. Centro Nacional de Investigación Agropecuaria "Tulio Ospina", Sección Fitopatología, Micoteca (Archivo y herbario micológico. 1958-1972). Citado por: CASTAÑO, J.J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

_____. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

CASTAÑO- ZAPATA, J.; DEL RIO, L. y ACOSTA, A. Hongos Fitopatógenos. En: Manual para diagnóstico de hongos, bacterias virus y nematodos fitopatógenos. Zamorano, Honduras : Zamorano Academia Press. 1997. p. 45-46.

CASTAÑO- ZAPATA, J. Principios básicos de fitopatología. 2ª ed. Zamorano, Honduras : Zamorano Academic Press. 1994. p. 156, 460.

CASTILLO, H.A. y SASTOQUE, L.M. Reconocimiento e identificación de enfermedades en tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt. en la Zona de Anaime-Cajamarca, departamento del Tolima. Ibagué, 1988, p. 116. Tesis de grado (Ingeniería Agronómica). Universidad del Tolima.

CASTRO, D. y DÍAZ, J. Alternativas para el manejo integrado del cultivo de la mora (*Rubus glaucus* B.). Rionegro (Antioquia), Colombia : Centro de Publicaciones, Universidad Católica de Oriente, 2001. 38. p.

CASTRO, D.; MÁRQUEZ, O.; RESTREPO, V.E. y VÉLEZ, G.I. Evaluación del estado fitosanitario del cultivo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) en el Oriente antioqueño. Rionegro (Antioquia), Colombia : Centro de Publicaciones, Universidad Católica de Oriente, 1995. p. 3 -14.

CEDEÑO, L. y PALACIOS, E. Antracnosis en mora de Castilla (*Rubus glaucus*) causada por *Glomerella cingulata* en Venezuela. En: Fitopatología Venezolana. 4 (1991); p.17-20.

CHARDON, C.E. and TORO A. Mycological explorations of Colombia. En: J. Dep. Agric., Pto Rico. Vol. 14, N°4 (1930); p. 195-369 Citado por: CASTAÑO, J.J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

_____. Plant disease notes from the Central Andes II. En: Phytopathology 19 (1929); p. 969-974. Citado por: CASTAÑO, J.J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

CHIQUITO, C. H. Período de incubación de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en frutos de tomate de árbol de diferente edad. En : CONGRESO ASCOLFI (1998 : San Juan de Pasto). Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología. San Juan de Pasto : Ascolfi, 1998. p.1.

CLEMENTS, F.E. and SHEAR, C.L. The genera of fungi. New York. 1931. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* En: BAILEY, J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

CORDA, A. C.I. Sturm's Deutschlands Flora. Nürnberg, Germany. Vol. 3 (1837a); p. 1-144. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* En: BAILEY, J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

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

_____. Estado del arte de los frutales priorizados en la Regional 9. Manizales. 1996a. p. 7-26, 34 -48, 76 -91, 100 -114.

_____. Informe sobre actividades. Santa Rosa de Osos (Antioquia) : Creced Altiplano Norte de Antioquia, 1997. 20 p.

_____. Primer taller de trabajo del proyecto nacional para el control de la Antracnosis del tomate de árbol : Resumen y subproyectos. (Documento mecanografiado- C.I. Tibaitata). Santafé de Bogotá. (11-12 de Abril, 1996b); 12 p.

_____. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas-MIP (Documento mecanografiado). Bogotá : Centro de Investigación Tibaitata, 1998. 6 p.

_____. Protocolo proyecto MEAE-4. Reconocimiento de enfermedades en tomate de árbol y mora. Medellín : CORPOICA Regional 4, 1994. p. 7-26, 34-48,76- 91, 100- 114.

DEL RÍO, L. y SAUCEDA, N. Bacterias Fitopatógenas. En: Manual para diagnóstico de hongos, bacterias virus y nematodos fitopatógenos. 1ª. Ed. Zamorano, Honduras : Zamorano Academic Press, 1997. p. 45-46.

DELGADO, F. Manual de técnicas moleculares teoría. Manizales : Universidad Católica de Manizales - Facultad de Ciencias de la Salud, 2002. 122 p.

DHINGRA, O. and SINCLAIR, J. Basic plant pathology methods. Boca Raton, Florida : CRC Press, Inc. Corporate Blvd., N.W. 33431, 1985. p 15-61, 163-168, 264-269.

DIKO, B.J., and MORDEU, J.E. *Colletotrichum acutatum*: CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N°. 630. Kew, United Kingdom : Commonwealth Mycological Institute, 1979.

DODD, J.C.; ESTRADA, A.; MATCHAM, J.; JEFFRIES, P. and JEGER, M.J. The effect of environmental factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of mango Anthracnoses, in the Pilippines. En: Plant Pathology 40 (1991); p. 468-575. Citado por: BOTERO, M.J. Interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., agente causal de la Antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betaceae* (Cav.) Sendt.). Manizales, 2001, p. 1-8, 13-18, 20-21, 23, 70, 74, 105, 106. Trabajo de tesis (programa de Maestría en Fitopatología). Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

DUKE, M.M. The genera *Vermicularia* Fr. and *Colletotrichum* Cda. Transactions of the British Society 13 (1928); p. 16-184. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: BAILEY, J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

DYER, T. and KURT, L. Contamination, error, and non-specific molecular tools. En: Phytopathology. Vol.90, N° 6 (2000); p. 565-567.

ESPINAL, L. S. Apuntes ecológicos. Medellín : Lealon, 1992. p. 109-113.

FAO. Manual para patólogos vegetales. Lima : Pacific Press, 1985. 437 p.

FERREIRA, M. y GRATTAPAGLIA, D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia : Ministerio da Agricultura e do Abastecimento-MA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, 1998. 221 p.

FONT QUER, P. Diccionario de botánica. Barcelona : Labor S.A., 1985. p. 73.

FORERO DE LA-ROTA, M. C. Enfermedades de importancia económica en mora de Castilla (*Rubus glaucus* L.). En: CONGRESO ASCOLFI (1993 : Santa Marta). Memorias del XIV congreso Nacional de Fitopatología. Santa Marta : Ascoffi, 1993. p. 101.

FORERO DE LA-ROTTA, M.C.; AVILA, W. y GONZÁLEZ, R. Estudio sobre "Antracnosis" en mora de Castilla. En: SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRIO MODERADO (2002 : Medellín). Memorias del Cuarto Seminario Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado. Medellín : CORPOICA, CDTF, UPB. p. 220-228.

FÖSTER, H. and ADASKAVEG. J. E. Identification of populations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond Anthracnose in California. En: Phytopathology 89(1999); p. 1056- 1065. Citado por: WHARTON, P. and DIÉGUEZ-URBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. En: Anales del Jardín Botánico de Madrid. Vol. 61, Nº 1 (2004); p. 3-22.

FRANCO, G. y GIRALDO, M. El cultivo de la mora. Manizales : Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Regional 9, 2000. p. 46.

_____. _____ . Manizales : Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica); Regional 9 - Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria (Pronatta), 1998. p. 56-57.

FREEMAN, S. and SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. En: Physiological and Molecular Plant Pathology 49 (1996); p 395-404.

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S. and SHARON, A. Survival and host specificity of *Colletotrichum acutatum* from strawberry. *ISHS Acta Hort.* 567 (2002); p. 619-622.

FREEMAN, S.; KATAN, T. and SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. En: *Plant disease.* Vol. 82 N° 6 (1998); p. 596-604.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; MAYMON, M. and ZVEIBIL, A. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. En: *Phytopathology* 91 (2001); p. 586-592.

FRENCH, E. y HEBERT, T. Métodos de investigación fitopatológica. San José de Costa Rica : Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1982. p. 33-38, 47-55, 65-68, 151-152, 154-186.

FRIES, E.M. *Systema Mycologicum* 1-3. (1821-1832), Gryphiswald. Citado por SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* En: BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control.* Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

FROST, R.R. Seta formations in *Colletotrichum*. En: *Nature* 201 (1964); p. 730-731. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* En: BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control.* Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

GARCÍA, C. M. Aislamiento y determinación estructural de los metabolitos secundarios y de biotransformación del hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Cádiz – España, 2001, p. 1-48. Tesis de grado. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Orgánica.

GIL, F.; BAILEY, J.; O'CONNELL, R. and SHERIFF, C. Caracterización morfológica y celular de aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos de *Phaseolus vulgaris*, *Vigna radiata* y *Vigna unguiculata*. En: *Fitopatología Colombiana.* Vol. 18 N° 1 (1994); p. 42-52.

GIL, F. Morphological and celular characterization of *Colletotrichum* isolates from *V. radiata*, *V. unguiculata* and *P. vulgaris* : project report for the MSc. degree in crop protection. Inglaterra, 1992, 42 p. University of Bristol.

GIRARD, E. y LOBO, M. El cultivo del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). Manual de Asistencia Técnica N° 32. Bogotá : Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 1987. p. 42.

_____. Ensayo preliminar para el control de la Antracnosis del tomate de árbol. En: Fitopatología Colombiana. Vol. 6 N° 2 (1977); p.122-129.

GÓMEZ, J. E. Secamiento de ramas de mora *Rubus glaucus* causada por *Gloeosporium* sp. En: Ascolfi Informa. Vol. 18 N° 2 (1992); p.17.

GONZÁLEZ, R.; AVILA, W.; F DE LA ROTTA, M.C. y VARGAS, A. Estudios sobre la severidad y avance del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* agente causante de la Antracnosis en mora de Castilla. En : CONGRESO ASCOLFI (2003 : Armenia). Memorias del XXIV Congreso Nacional de Fitopatología. Armenia : Ascolfi, 2003. p. 5.

GREUTER, *et al.* Internacional Code of Botanical Nomenclature. Regnum Vegetabile 118 (1988); p. 1-328. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* En: BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

GROVE, W.B. British stem and leaf Fungi II. Cambridge : Cambridge University Press, 1937. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

GUERBER, J. C. and CORRELL, J.C. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. En: Mycologia. Vol. 93, N° 1 (2001); p. 216-229. Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

GUERBER, J. C. and CORRELL, J.C. The first report of the teleomorph of *Colletotrichum acutatum* in the United States. En: Plant Disease. Vol. 81, Nº 11 (1997); p.1334.

GUNNEL, P.S. and GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. En: Mycologia. Vol. 84, Nº 2 (1992); p. 157-165
Citados por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

GUNNELL, P.S. and DOUGLAS, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. En: Mycología. Vol. 84, Nº 2 (1992); p. 157-165.

HARTUNG, J.S.; BURTON, C.L. and RAMSDELI, D.C. Epidemiological studies of blueberry Anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. En: Phytopathology. Vol. 71, Nº 4 (1981); p. 449-453.

HAUZER, R. Estudio entomológico y patológico del algodonoero. En: Soc. de Agricultores de Colombia, Rev. Nal. De Agricultura. Vol. 13, Nº 116 (1918); p. 1544-1548. Citado por: CASTAÑO, J. J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

HERRERA, A. Manual de medios de cultivo. La Habana : Editorial Científico-técnica, 1985. p. 155-156.

HILLIS, D. and MORITZ C. An overview of applications of molecular systematics. 1996. p. 502-515.

HINDORF, H. *Colletotrichum* spp. Isolated from *Coffea arabica* L. in Kenya. En: Zeitschrift für Pflanzkrankheiten und Pflanzschutz. Vol.77, Nº 6 (1970); p.328-331. Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

HOLLIDAY, P. Fungus diseases of tropical crops. New Cork : Dover Publications, 1995. Citado por FORERO DE LA-ROTTA, M.C.; ÁVILA, W. y GONZÁLEZ, R. Estudio sobre "Antracnosis" en mora de Castilla. En : SEMINARIO NACIONAL FRUTALES DE CLIMA FRIO MODERADO (2002 : Medellín). Memorias del Cuarto Seminario Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado. Medellín : CORPOICA, UPB, CDTF, 2002. p. 220-228.

HOWARD, C.M. and ALBREGTS, E.E. Black leaf spot phase of strawberry Anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (= *C. fragariae*). En: Plant Disease 67 (1983); p. 1144-1146. Citado por: GUNNELL and DOUGLAS. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. En: Mycología. Vol. 84, N° 2 (1992); p. 157-165.

JENKINS, A.E. History of term antracnose. En: Phytopathology. 23 (1993); p. 389. Citado por FORERO DE LA-ROTTA, M.C.; ÁVILA, W. y GONZÁLEZ, R. Estudio sobre "Antracnosis" en mora de Castilla. En : SEMINARIO NACIONAL FRUTALES DE CLIMA FRIO MODERADO (2002 : Medellín). Memorias Cuarto Seminario Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado. Medellín : CORPOICA, UPB, CDTF, 2002. p. 220-228.

JOHNSTON, P.R. The importance of phylogeny in understanding host relationships within *Colletotrichum*. En: D. PRUSKY, S.; FREEMAN, and DICMAN, M. eds. *Colletotrichum*. Host specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction. St. Paul, MN. : APS Press., 2000. Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

JOHNSTON, P.R. and JONES, D. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using RDNA sequences. En: Mycologia 83 (1977); p. 420-430. Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

KAUFMANN, P.J. and WEIDEMANN, G.J. Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five hosp genera. En: Plant Disease 80 (1996); p.1289-1293.

LARDNER, R.; JOHNSTON P.R.; PLUMMER, K.M. and PEARSON, M.N. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. En: Mycological Research 103 (1999); p. 275-285. Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

LATHAM, A.J. and WILLIAM, J.C. Cultural characteristics and pathogenicity of *Glomerella cingulata* isolates from apples in Alabama. En: Plant Disease 67 (1983); p. 1065-1068.

LATUNDE-DADA, A. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. En: Molecular plant pathology Vol. 2, N° 4 (2001); p. 187-198.

LOURD, M.; GEIGER, P, J. y GOUJON, M. Les *Colletotrichum* agents d'Anthraxses en Cote-d'Ivoire. I.- Caracteristiques morphologiques et culturales d'isolats de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. En: Ann Phytopathol. Vol. 11, N° 4 (1979); p. 483-495.

MACCRACKEN, A.R and SWINBURNE, T.R. Siderophores produced by saprophytic bacteria as stimulants of germination of conidia of *Colletotrichum musae*. En: Physiological Pathology 15 (1979); p. 331-340.

MADDEN, L.V.; YANG, X. and WILSON L.L.. Effects of rain intensity on dispersal of *Colletotrichum acutatum*. En: Phytopathology 86 (1996); p. 864-874.

MANIRE, CH.; RHINEHART, H.; SUTTON, D.; THOMPSON, E.; RINALDI, M.; BUCK, J. and JACOBSON, E. Disseminated mycotic infection caused by *Colletotrichum acutatum* in a Kemp's Ridley sea turtle (*Lepidochelys kempy*). En: Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40 N° 11, (2002); p. 4273-4280.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.; BARRIO, E.; GARCIA, M.D. and QUEROL, A. Identification of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. En: FEMS Microbiology Letters 189 (2000); p.97-101.

MEJIA, R. Enfermedades de la papa, algodón, arroz, cabuya, caña de azúcar y cacao. En: El Agricultor Boyacense. 3 (1940); p.221-258. Citado por: CASTAÑO, J. J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia. Medellín : Letras, 1978. 164 p.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S., and BROWN, A.E. Detecction of the Anthracnose Pathogen *Colletotrichum*. 1994. p. 183-189. En: A SCHOTS, F.M. DEWEY, and R. OLIVER, (Eds.). Modern Assay for Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification. Oxford : CAB International. Citado por: ADASKAVEG, J. E. and HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. En: Phytopathology 87 (1997); p. 979-987.

MILLS, P.R.; HODSON, A. and BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. En: BAILEY, J.A. and JEGER, M.J.(Eds.). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford, UK : CAB International, 1992. p. 269-287.

MONTOYA, C A.; HINCAPIE, L. A. y URIBE, V. Principales enfermedades y plagas en el cultivo de la mora. Manizales : Litoas, 1997. p. 11,15. Boletín técnico Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Seccional Caldas, Risaralda y Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria (UMATA) - Quinchia, Risaralda.

MORDUE, J.E.M. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi. 1971. N° 315, 316, 317. Citado por MILLS, P.R.; HODSON, A. and BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. En : BAILEY, J.A. and JEGER, M.J.(Eds.). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford UK : CBA. International, 1992. p 269-287.

MULLIS, K. B. Reacción en cadena de la polimerasa. s.l : s. Ed., 1984. p. 30-37(Fotocopiado).

NAG RAJ, T.R. Genera *Coelomycetum*. X. *Ellisiella*, Samukuta, and Sakireeta. En: Canadian Journal of Botany 51 (1973); p. 2463-2472. Citado por: SUTTON, B C. The Coelomycetes : Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Kew, London : Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

NAVARRO R. Enfermedades del tomate de árbol y su control. Documento mecanografiado. Archivo Centro de Diagnóstico Vegetal ICA C.I Tulio Ospina, Bello - Antioquia, Colombia. 1990. p. 4-5.

NAVARRO, R. A. y PUERTA, O.D. Proceso de infección por *Gloeosporium* sp. en frutos de tomate de árbol *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. En: Actualidades ICA, Regional 4. Boletín Informativo año 5 N° 58 (1991); p. 4.

_____. En: Ascolfi Informa. Vol. 4, N° 3 (1978); p. 6-7.

NEILANDS, J. B.. Microbial iron transport compounds (siderochromes). En: By. G. EICKHORN (Ed.). Bioinorganic Chemistry. p. 167-202. Citado por: BOTERO, M. J. Interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., agente causal de la Antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betaceae* (Cav.) Sendt.). Manizales, 2001, p. 1-8, 13-18, 20-21, 23, 70, 74, 105, 106. Tesis de grado. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Maestría en Fitopatología.

NOBEL, J.P. The biochemical basis of latency in bitter-pit of apple. 1981. Thesis Ph.D. University of Birmingham Citado por: GARCIA, C. M. Aislamiento y determinación estructural de los metabolitos secundarios y de biotransformación del hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Cádiz- España, 2001, p. 1-48. Tesis de grado. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Orgánica.

NOVAI, C. Medios de cultivo y pruebas de diagnóstico. En: Manual de Laboratorio, Diagnóstico de Hongos, Bacterias, y Nemátodos Fitopatógenos. Madrid : Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. Centro de Publicaciones, 1991. p 379 -409.

OBREGON, R. 1966-72. Varios aspectos micológicos. Facultad de Agronomía (Medellín). Secc. Fitopatología, Micoteca. Citado por: CASTAÑO, J. J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

ORGANISATION EUROPÉENNE ET MEDITERRANÉENNE POUR LA PROTECTION DES PLANTES / European and Mediterranean Plant Protection Organization OEPP/EPPO. Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. *Glomerella acutata*. Bulletin 34 (2004); p.193-199.

ORJUELA, J. Índice de enfermedades de plantas cultivadas en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y Oficina de Investigaciones Especiales (OIE). Bogotá. Bol.tec. 11 (1965); p. 1-66. Citado por: CASTAÑO, J. J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

OSORIO, J. A. Cítricos: sus enfermedades limitantes y perspectivas de manejo sostenible. En : CONGRESO ASCOLFI (2003 : Armenia). Memorias del XXIV Congreso Nacional de Fitopatología. Armenia : Ascolfi, 2003. p. 56.

_____. Como pensar y desarrollar la investigación agrícola en la Corpoica del futuro: Horizonte 2003-2007 (Documento en elaboración). CORPOICA, C.I. Tibaitata. Mosquera, Cundinamarca. 2003. p.6.

OSPINA, E.A. y ARANZAZU, F. Determinación de la existencia de infecciones quiescentes causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en frutos de tomate de árbol (*Solanum betacea*). En : CONGRESO ASCOLFI (1999 : Manizales). Memorias XX Congreso Nacional de Fitopatología. Manizales : Ascolfi, 1999. p. 55.

PARBERY, D.G. y BLAKEMAN, J. P. Effect of chemical substances associated with the surfaces of plant leaves on appressorium formation by *Colletotrichum acutatum*. En: Transactions of the British Mycological Society. 1978. p. 153-159.

PARDO, V. M. Hongos fitopatógenos de Colombia. Medellín : Centro de Publicaciones, Universidad Nacional de Colombia, 1995. p. 98-100.

_____. Índice de hongos fitopatógenos de las plantas cultivadas en Colombia. Medellín : Centro de Publicaciones Universidad Nacional sede Medellín, 1990. p. 16.

PATIÑO, H. 1968-1970 Adiciones al índice de enfermedades de plantas cultivadas en Colombia. En : Memorias I Reunión Nacional de Fitopatología y Sanidad Vegetal, ICA-ITA (Pasto), Tomo II, 78 p. Citado por: CASTAÑO, J. J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

PEREZ, L. Enfermedades de las plantas. Medellín : Lealon, 1993. p. 46-51.

PETRAK, F. and SYDOW, H. Kritisch-systematische originaluntersuchungen über Pyrenomyzeten, Sphaeropsideen und Melanconieen. VI. Annales mycologici, Berlin 33 (1935); p. 157-193. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* En : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1-26.

PRUSKY, D. and PLUMBLEY, R. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. En: BAILEY, J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992., p 289-305.

PUERTA, O.D. y ISAZA, L. Estudios preliminares del comportamiento de algunas cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* en tomate de árbol. En : CONGRESO ASCOLFI (1983 : Cali). Memorias del V Congreso Nacional de Fitopatología. Cali : Ascolfi, 1983. p. 78-79.

_____. Estudios preliminares del comportamiento de algunas especies de *Colletotrichum* con *Colletotrichum gloeosporioides* en tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). En: Actualidades ICA, Regional 4. Boletín Informativo año 6 N° 63, (1992); p 5-7.

_____. _____ . En: Ascolfi Informa. Vol. 9, N°4 (1982); p. 24-26.

READER, U. and BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. En : Letters in Applied Microbiology. N°.1 (1985); p. 17-20.

RENDÓN, M. y AFANADOR, L. Estudios preliminares para la identificación y caracterización de especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a la Antracnosis del tomate de árbol. En : CONGRESO ASCOLFI (2001 : Medellín). Memorias del XXII Congreso Nacional de Fitopatología. Medellín : Ascolfi, 2001. p. 39.

ROMERO, S. E. Caracterización morfológica, molecular y variabilidad patogénica del agente causal de la Antracnosis *Colletotricum gloeosporioides* en tomate de árbol en Colombia. Santafé de Bogotá, 1999, p. 18-27, 46-48, 55-70,79-95. Tesis de grado (Maestría en ciencias agrarias). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Área de fitopatología.

RONDÓN, J. G. Aspectos fisiológicos del tomate de árbol, epidemiología de la Antracnosis y su relación con el manejo del problema. En : SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRIO MODERADO (1998 : Manizales). Memorias del Segundo Seminario Frutales de clima Frío Moderado. Manizales : Corpoica-Regional 9, 1998. p. 34-38.

RONDÓN, G.; PÁEZ, P. y ZULUAGA, V. Estudio epidemiológico de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en tomate de árbol (*Solanum betacea*) en Sylvania (Cundinamarca). En : CONGRESO ASCOLFI (1999 : Manizales). Memorias del XX Congreso Nacional de Fitopatología. Manizales : Ascolfi, 1999. p. 56.

RONDÓN, G. Fenología del tomate de árbol, epidemiología de Antracnosis y su relación con el manejo del problema. En : CONGRESO ASCOLFI (1999 : Manizales). Memorias del XX Congreso Nacional de Fitopatología. Manizales : Ascolfi, 1999. p.57.

SACCARDO, P.A. Sylloge fungorum 4, (1886); p.1-807, Papua. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

SCHAAD, N.W. (ed.). Laboratory guide for identificaion of plant pathogenic bacteria. Second edition. The American Phytopathological Society, 1988. 165 p.

SALAZAR, H. y CASTAÑO, J. Análisis del estado actual de los problemas fitopatológicos del manzano (*Malus domestica* Borkh.) en el departamento de Caldas. En: Fítopatología Colombiana. Vol. 22 N°1 (1998); p. 13-18.

_____. En : SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE MANZANO (1995 : Manizales). Memorias Segundo Simposio Internacional sobre Manzano. Manizales : Artes Gráficas Tizan Ltda, 1995. p. 247- 255.

_____. Análisis del estado actual de los problemas del manzano (*Malus* sp.) en el departamento de Caldas. En : (CONGRESO ASCOLFI (1996 : Paipa). Memorias del XVII Congreso Nacional de Fitopatología y 1er Encuentro Internacional de Biotecnología Agronómica. Paipa, Colombia : Ascolfi, 1996. p. 28.

SALAZAR, H. y CASTAÑO, J. Principales enfermedades del manzano (*Malus* sp.), lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y mora (*Rubus glaucus* Benth.) en Caldas. En : SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRÍO MODERADO (1996 : Manizales). Memorias del Primer Seminario de frutales de Clima Frío Moderado. Manizales : Corpoica-Regional 9, 1996. p. 138-139.

SALAZAR, H.; CASTAÑO, J. y CASTAÑO, O. Principales enfermedades y plagas asociadas a cultivos de manzano y durazno en Caldas. Manizales : Artes Gráficas Tizan Ltda, 1997. p. 12-13.

SALAZAR, R. Memorias cursos nacionales de frutales. Volumen. III. Programa Nacional de Frutales. Medellín : Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Noviembre de 1998. p. 32, 60, 80, 156.

SALDARRIAGA, A. y BERNAL, J. Enfermedades asociadas a los cultivos de mora (*Rubus glaucus* Benth.) en el departamento de Antioquia. En: SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRÍO MODERADO (2000 : Manizales). Memorias del Tercer Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales : Litoas, 2000. p. 132.

SALDARRIAGA, A.; BERNAL, J. y TAMAYO, P. Enfermedades del cultivo del tomate de árbol en Antioquia: Guía de reconocimiento y control. Boletín Técnico. Rionegro (Antioquia) : Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) C.I. La Selva, 1997. p. 8.

SALDARRIAGA, A. Etiología de la roña de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss en Urrao (Antioquia). Medellín 1989, 86 p. Tesis de grado (Ingeniera Agrónoma). Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Facultad de Agronomía.

SCHILDER, A. Optimum timing and use of strobilurin fungicides for disease control in strawberries. Department of Plant Pathology. 164 Plant Biology Building, Michigan State University. 2003 Email:schilder@msu.edu

SCHRENK, H. von and SPAULDING, P. The bitter-rot fungus. In: Science N.S. 17 (1903); p. 750-751. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

SIMMONDS, J.H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. En: Queensland Journal of Agriculture and Animal Science 22 (1965); p. 437-459. Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala-Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

_____. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. En: Queensland Journal of Agriculture and Animal Science 22 (1965); p. 437-459. Citado por: MILLS, P.R.; HODSON, A. and BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting Tropical Fruits. En: BAILEY, J.A. and JEGER, M.J.(Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 269-287.

SMITH, B.J. and BLACK, L.L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. En: Plant Disease 74 (1990); p. 69-76. Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

_____. En: Plant Disease 74 (1990); 69-76. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

SMITH, B.J. and BLACK, L.L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. En: Plant Disease 74 (1990); p. 69-76.

SOUTHWORTH, E.A. Additional observations on Anthracnose of hollyhock. En: Journal of Mycology 6 (1890b); p.115-116. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. and MILLS, P.R. Coffee berry disease pathogen in Africa: Genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. En: Mycol Res. 97(1993); p. 995-1000. Citado por: ADASKAVEG, J. E. and HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87(1997); p. 979-987.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. and MILLS, P.R. DNA secuencia variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry Anthracnose. En: *Physiol. Mol Plant Pathol.* 41 (1993); p. 265-281. Citado por: ADASKAVEG, J. E. and HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. En: *Phytopathology* 87(1997); p. 979-987.

SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P.; MEEHAN, B.M. and BROWN, A. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. En: *Genome* 39 (1996); p. 499-512. Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

SUTTON, B.C. Development of fructifications in *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. and related species. En: *Canadian Journal of Botany* 44 (1966); p. 887-897. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1-26.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

_____. The Coelomycetes. Kew, London : Commonwealth Mycological Institute, 1980. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

_____. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew, London : Commonwealth Mycological Institute, 1980. p. 530. Citado por MILLS, P.R.; HODSON, A. and BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. En : BAILEY, J.A. and JEGER, M.J.(Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 269-287.

SUTTON, B.C. The Coelomycetes : Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew, London : Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

SUTTON, B.C. and WATERSTON, J.M. 1970. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria N° 222. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

TAMAYO, P. Estado del arte de las enfermedades en el cultivo de frutales de clima frío moderado y su control. En : CONGRESO ASCOLFI (2001). Memorias del XXII Congreso Nacional de Fitopatología. Medellín : Ascolfi, 2001b. p. 91-101.

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

_____. Variación cultural y patogénica de *Colletotrichum gloeosporioides* del tomate de árbol. En: Informe Anual. ICA. Programa de Fitopatología.1984. p. 83-86.

TAMAYO, P. y BERNAL, J. Enfermedades. En: BERNAL, J. y DIAZ, C. (Compiladores). Tecnología para el cultivo del tomate de árbol. Manual técnico 3. Rionegro (Antioquia) : Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) C.I. La Selva, 2003. p. 74-75.

TAMAYO, P. y PELÁEZ, A. Caracterización de daños y pérdidas causadas por enfermedades del fruto de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) en Antioquia. En : SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRIO MODERADO (2000 : Manizales). Memorias del Tercer Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales : Litoas, 2000. p. 174-178.

TELLO, J.; VARES, F. y LACASA, A. Análisis de muestras. En: Manual de Laboratorio, Diagnóstico de Hongos, Bacterias, y Nemátodos Fitopatógenos. Madrid, España : Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. Centro de Publicaciones, 1991. p 39-48.

TELLO, J.; VARES, F. y LACASA, A. Selección y tratamiento de las muestras. En: Manual de Laboratorio, Diagnóstico de Hongos, Bacterias, y Nemátodos Fitopatógenos. Madrid, España : Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. Centro de Publicaciones, 1991. p 29-38.

TELLO, J.; FISAC, R. y VARES, F. Conservación de microorganismos fitopatógenos: Hongos. En: Manual de Laboratorio, Diagnóstico de Hongos, Bacterias, y Nemátodos Fitopatógenos. Madrid, España : Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. Centro de Publicaciones, 1991. p 87-94.

THE ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. RHS. Colour chart. London SW1P 2P.E. Copyright The Royal Horticultural Society 80 Vincent Square, 1996.

TODE, H.J. Fungi meclenbergensis Selecti 1 (1790); p. 1-64. Luneburg. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En : BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

TORO, H. Problemas patológicos del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.), en Colombia. En : CONGRESO ASCOLFI (1991 : Manizales). Memorias del XII Congreso Nacional de Fitopatología. Patología de frutales. Manizales : Ascolfi, 1991. p. 23-31.

_____. En : CONGRESO ASCOLFI y XIII Reunión APS-CD (1982 : Santiago de Cali). Memorias del V Congreso Nacional de Fitopatología. XIII Reunión APS-CD. Santiago de Cali : Ascolfi, 1982. p. 287-289.

TORO, R.A. Enfermedades y plagas de las plantas. Escuela Agrícola y Veterinaria (Medellín), Cir. N° 4 (1927); 33 p. Citado por: CASTAÑO, J.J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

_____. Nota preliminar sobre las enfermedades del cacao en Zarzal. Sociedad de Agricultores de Colombia. En: Rev. Nacional de Agricultura 25 (1929); p. 114-126. Citado por: CASTAÑO, J.J. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Medellín : Letras, 1978. 164 p.

ULLOA, M. and HANLIN, T. Illustrated dictionary of Mycology. St. Paul, Minnesota : APS Press, 2001. p. 87, 108, 130, 164, 266.

VASSILJEVSKY, N.I. and KARAKULIN, B.P. Fungi imperfecti parasitici. Pars II. Melanconiales. Moscow, Leningrad. 1950. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En : BAILEY, J.A. and JEGGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1- 26.

VILLA, J. Cultivo del tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.). Medellín : Politécnico Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Ciencias y Tecnologías Aplicadas, Tecnología Agropecuaria, 1996. p. 73-75.

_____. El cultivo del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). Medellín : Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, 1991. p. 103-107.

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

VINNERE, O. and FATEHI, J.U. What is *Glomerella miyabeana*? (Papers IV manuscript). Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

VINNERE, O.; FATEHI, J.; WRIGHT, S.A.I and GERHARDSON, B. The causal agent of Anthracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia. (Papers I) (sf). Citado por: VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

WALKER, J.; NIKANDROW, A. and MILLAR, G.D. Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in *Colletotrichum*. En: Mycological Research 95 (1991); p. 1175-1193 Citado por VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala- Sweden, 2004, 42 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Uppsala University.

WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. En: BAILEY, J.A. and JEGER, M.J.(Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 167-185.

WESTENDORP, G.D.. Description de quelques cryptogames inedites ou nouvelles pour la flore de deux Flandres. En: Bulletin de l'Academie de Sciences, Bruxelles 12 (1861); 5. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1-26.

WHARTON, P.S. and DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. En: Anales del Jardín Botánico de Madrid. Vol. 61, Nº 1 (2004); p. 3-22.

WHITESIDE, J.O; GARNSEY, S.M. y TIMMER L.W. Plagas y enfermedades de los cítricos. Madrid, Barcelona : The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi Prensa, 1996. p. 9-12.

WILSON, G.W. The identity of the Anthracnose of grasses. En: Phytopathology 4 (1914) p.106-112. Citado por: SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1-26.

WOLLENWEBER, H.W and HOCHAPFEL, H. Beiträge zur kenntnis parasitärer und saprophytischer Pilze VI. En: Zeitschrift für Parasitenkunde 1 (1949); p.138-173 Citado por SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: BAILEY J.A. and JEGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK : CAB International, 1992. p. 1-26.

ANEXO 1. Especies de *Colletotrichum* patógenas o asociadas con plantas de interés económico para la agricultura Colombiana.

Se presenta el hospedante seguido de la especie del hongo donde se registra el nombre del holomorfo, complementado con el nombre del anamorfo y sinanamorfo si la especie lo presenta y si es conocido, e incluye además, los sinónimos que han sido usados en la literatura colombiana y los de uso común en la literatura universal.

HOSPEDANTE	HONGO	ENFERMEDAD
Achiote (<i>Bixa</i> L., <i>Bixa orellana</i> (L.).)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Aguacate (<i>Persea</i> Mill., <i>P. americana</i> Miller., <i>Persea</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis en hojas y frutos
Ají (<i>Capsicum</i> L., <i>C. baccatum</i> L., <i>C. frutescens</i> L., <i>Capsicum</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Algodón (<i>Gossypium</i> L., <i>G. barbadense</i> L., <i>G. herbaceum</i> L., <i>G. hirsutum</i> L., <i>Gossypium</i> sp., <i>Gossypium</i> X <i>Gossypium</i>).	<i>Glomerella gossypii</i> Edgerton. Anamorfo: <i>Colletotrichum gossypii</i> Southworth.	Antracnosis
Anón (<i>Annona</i> L., <i>Annona squamosa</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Anturio (<i>Anthurium</i> Schott., <i>A. andreaum</i> Linden. <i>Anthurium</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Arveja (<i>Pisum</i> L., <i>P. sativum</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Colletotrichum pisi</i> Pat.	Antracnosis

Badea (<i>Fassifora</i> L., <i>P. quadrangularis</i> L.)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Banano (<i>Musa</i> L. grupos AA, AAA, AAB, ABB)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. <i>Colletotrichum musae</i> (Berk. & Curtis) Arx. = <i>Gloeosporium musarum</i> Cooke & Masee.	Antracnosis
Berenjena (<i>Solanum</i> L., <i>S. melongena</i> L.)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Cacao (<i>Theobroma</i> L., <i>Theobroma cacao</i> L., <i>Theobroma</i> sp.)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis foliar y muerte de pepinos.
Café (<i>Coffea</i> L., <i>C. arabica</i> L.)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Mancha mantecosa, Mancha de Buriticá.
Camella (<i>Camellia</i> L., <i>C. japonica</i> L.)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Camote (<i>Ipomoea</i> L., <i>I. batatas</i> (L.) Lam.)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Caña de azúcar (<i>Saccharum</i> L., <i>S. officinarum</i> L., <i>Saccharum X Saccharum</i> .)	<i>Glomerella tucumanensis</i> (Speg.) Arx & Muller. = <i>Physalospora tucumanensis</i> Speg. Anamorfo: <i>Colletotrichum falcatum</i> Went.	Pudrición roja, Corazón rojo, Muermo rojo

Capica (<i>Stylosanthes</i> Sw., S. <i>capitata</i> Vog.).	<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove. <i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Carambola (<i>Averrhoa</i> L., A. <i>carambola</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Cardamomo (<i>Elettaria</i> Maton., <i>E. cardamomum</i> (L.) Maton.).	<i>Glomerella tucumenensis</i> (Spegazzini) Arx & Muller. Anamorfo: <i>Colletotrichum falcatum</i> Went	Antracnosis aceitosa del fruto
	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Mancha rectangular de fleco.
Cártamo (<i>Carthamus</i> L., C. <i>tinctorius</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Catleya (<i>Cattleya</i> Lindl., C. <i>dowiana</i> Batem., <i>C. trianaei</i> Linden & Reichb., <i>Cattleya</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. = <i>Physalospora orchidearum</i> Henn. = <i>Physalospora camptospora</i> Sacc. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Macrophoma cattleyicola</i> Henn. = <i>Gloeosporium oncidii</i> Oudem. = <i>Colletotrichum orchidearum</i> Allesch. = <i>Colletotrichum vanillae</i> Scalia. = <i>Gloeosporium vanillae</i> Cooke.	Antracnosis
Caucho (<i>Hevea</i> Aubl., H. <i>brasiliensis</i> (Willd. Juss.) Mull.- Arg.), <i>Hevea</i> sp.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Caupi (<i>Vigna</i> savi., V. <i>unguiculata</i> (L.) Walp. (= V. <i>sinensis</i> (L.) Savi).	<i>Colletotrichum truncatum</i> (Schwein.) Andrus & Moore. = <i>Colletotrichum dematium</i> (pers.) Grove f. sp. <i>Truncatum</i> (Schwein.) Arx. = <i>Colletotrichum glycines</i> Hori. = <i>Colletotrichum viciae</i> Deam. & Overh.	Antracnosis

Cebolla (<i>Allium</i> L., <i>A. Ceba.</i> , <i>A. fistulosum</i> L., <i>A. porrum</i> L.).	<i>Colletotrichum circinans</i> (Berk.) Voglino. = <i>Vermicularia circinans</i> Berk.	Antracnosis
Centrosema (<i>Centrosema</i> (DC.) Benth., <i>C. pubescens</i> Benth., <i>C. acutifolium</i>).	<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove. <i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Ciruelo (<i>Prunus</i> L., <i>P. domestica</i> L., <i>P. salicina</i> Lindl.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Ciruelo calentano (<i>Spondias</i> L., <i>S. purpurea</i> L., <i>Spondias</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Cítricos (<i>Citrus</i> L., <i>C. aurantifolia</i> (L.) Swingle., <i>C. aurantium</i> L., <i>C. jambhiri</i> Lush., <i>C. latifolia</i> Tanaka., <i>C. limon</i> Burm. C. <i>reticulata</i> Blanco. <i>C. sinensis</i> Osbeck., <i>Citrus X Citrus</i>).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium limeticola</i> Clausen. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
	<i>Colletotrichum</i> Corda (no <i>gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.).	Antracnosis
Coliflor (<i>Brassica</i> L., <i>B. oleraceae</i> L. var. <i>botrytis</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Curuba (<i>Passiflora</i> L., <i>P. mollissima</i> (H.B.K.) Bailey., <i>Passiflora</i> sp., <i>Passiflora X Passiflora</i>).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Epidendro (<i>Epidendrum</i> L., <i>Epidendrum</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. = <i>Physalospora orchidearum</i> Henn. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Estilosantes (<i>Stylosanthes</i> Sw., <i>S. guianensis</i> (Aubl.) Sw.).	<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove. <i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis

Fique (<i>Agave</i> L., <i>Furcraea</i> Venten.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Colletotrichum agaves</i> Cavara. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
	<i>Colletotrichum crassipes</i> (Speg.) Arx. = <i>Gloeosporium crassipes</i> Speg. = <i>Gloeosporium agaves</i> Syd.	Pudrición negra.
Fresa (<i>Fragaria</i> L., <i>F. chiloensis</i> (L.) Duchesne., <i>Fragaria</i> sp., <i>Fragaria X Fragaria</i> .).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Colletotrichum fragariae</i> Brooks. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Frijol (semillas) (<i>Phaseolus</i> L., <i>P. coccineus</i> L., <i>P. lunatus</i> L., <i>P. vulgaris</i> L., <i>Phaseolus</i> sp.).	<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove. = <i>Vermicularia dematium</i> (Pers.) Fr. = <i>Colletotrichum carpophilum</i> Kellerm. & Swingle. = <i>Colletotrichum erumpens</i> Sacc.	
Frijol	<i>Glomerella lindemuthiana</i> Shear. Anamorfo: <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Sacc. & Magnus) Lams – Scrib.	Antracnosis
Frijol canavalia (<i>Canavalia</i> DC., <i>C. ensiformis</i> (L.) DC. <i>Canavalia</i> sp.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Gardenia (<i>Gardenia</i> Ellis., <i>G. jasminoides</i> Ellis., <i>G. florida</i> L., <i>G. grandiflora</i> Loser. <i>Gardenia</i> sp.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Granadilla (<i>Passiflora</i> L., <i>P. ligularis</i> Juss.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Guadua (<i>Guadua</i> H. B. K., <i>G. angustifolia</i> Kunth., <i>G. latifolia</i> H. B. K.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis foliar
Guanábana (<i>Annona</i> L., <i>A. muricata</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis

	= <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	
Guayaba (<i>Psidium</i> L., <i>P. guajava</i> L., <i>P. cattleianum</i> Sabine. <i>Psidium</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis.
Guayaba feijoa (<i>Feijoa</i> Berg., <i>Feijoa</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Guayacán (<i>Tabebuia</i> Gomes ex DC., <i>T. chrysantha</i> Blake., <i>T. dugandii</i> Stand., <i>T. rosea</i> DC., <i>T. serratifolia</i> (Vahl.) Nichols., <i>T. viparia</i> (Raf.) Sandw. (= <i>T. pentaphylla</i> (L.) Hemsl.	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis del tallo
Haba (<i>Vicia</i> L., <i>Vicia faba</i> L.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Higo (<i>Opuntia</i> Mill., <i>O. caribaea</i> Britton & Rose., <i>O. ficus - indica</i> (L.) Mill., <i>Opuntia</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Icaco (<i>Chrysobalanus</i> L., <i>C. icaco</i> L.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Iraca (<i>Carludovica</i> Ruiz & Pav., <i>C. palmata</i> Ruiz & Pav.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Lulo (<i>Solanum</i> L., <i>S. quitoense</i> Lam., <i>Solanum</i> sp.)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Macadamia (<i>Macadamia</i> f.v. Muell., <i>M. integrifolia</i> Maiden & Betcke.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Maíz (<i>Zea</i> L. = <i>Euchlaena</i> Schrad., <i>Z. mays</i> L. = <i>Z. mays</i> L. subsp. <i>mays</i> L. = <i>Z. mays</i> L. var. <i>Saccharata</i> (Sturtev.) Bailey. = <i>Z. mays</i> L. var. <i>Rugosa</i> Bonaf.).	<i>Glomerella graminicola</i> Politis. Anamorfo: <i>Colletotrichum graminicola</i> (Ces.) Wils. = <i>Vermicularia graminicola</i> Westend. = <i>Ellisiella mutica</i> Wint. = <i>Colletotrichum sublineola</i> Henn.	Antracnosis de la caña y hojas.
Malanga (<i>Xanthosoma</i> Schott., <i>X. Mafafa</i> Schott., <i>X. Saggitifolium</i> (L.) Schott., <i>X.</i>	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis

<i>Violaceum</i> Schott)	= <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	
Mamoncillo (<i>Melicoccus</i> P. Br., <i>M. bijugatus</i> Jacq.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Mango (<i>Mangifera</i> L., <i>M. indica</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium mangiferae</i> Henn.	Antracnosis
Maní (<i>Arachis</i> L., <i>A. hipogea</i> L., <i>Arachis</i> sp.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Manzano (<i>Malus</i> Mill., <i>M. domestica</i> Borkh. = <i>Pyrus malus</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Maracuya (<i>Passiflora</i> L., <i>P. edulis</i> Sims.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Añublo foliar
Marañón (<i>Anacardium</i> L., <i>A. occidentale</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Mora (<i>Rubus</i> L., <i>R. bogotensis</i> H. B. K., <i>R. floribundus</i> H.B.K., <i>R. glaucus</i> Benth., <i>R. urticaefolius</i> Poir., <i>Rubus</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Nispero (<i>Manilkara</i> Van Royen., <i>M. zapota</i> (L.) Van Royen. = <i>Achras zapota</i> L.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Name (<i>Dioscorea</i> L., <i>D. alata</i> L. <i>Discorea</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Palma real (<i>Euterpe</i> Mart., <i>E. edulis</i> Mart.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis

Papaya (<i>Carica</i> L., <i>Carica papaya</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorpho: <i>Colletotrichum gbeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Colletotrichum caricae</i> Syd. = <i>Colletotrichum papayae</i> Henn.	Antracnosis
Papayuelo (<i>Carica</i> L., <i>C. cundinamarcensis</i> Linden., <i>C. fructifragans</i> García & Hernández., <i>C. goudotiana</i> Tr. & Pl., <i>C. pentagona</i> Heilbom., <i>C. pyriformis</i> Willd., <i>Carica</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorpho: <i>Colletotrichum gbeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Pepino dulce (<i>Solanum</i> L., <i>S. muricatum</i> Ait.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorpho: <i>Colletotrichum gbeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Pimentón (<i>Capsicum</i> L., <i>C. annum</i> L., <i>Capsicum</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorpho: <i>Colletotrichum gbeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Pimienta (<i>Piper</i> L., <i>P. nigrum</i> L.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Piña (<i>Ananas</i> Mill., <i>A. comosus</i> (L.) Merr., <i>Ananas</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorpho: <i>Colletotrichum gbeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Pitaya (<i>Acanthocereus</i> (Berger) Britt. & Rose., <i>A. pitajaya</i> (Jacq.) Dugand., <i>A. pentagonus</i> (L.) Britt. & Rose., <i>Hylocereus</i> Britt. & Rose., <i>H. polyrhizus</i> (Weber) Britt. & Rose., <i>H. undatus</i> (Haworth.) Britt. & Rose).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorpho: <i>Colletotrichum gbeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Remolacha (<i>Beta</i> L., <i>B. vulgaris</i> L.).	<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove.	Antracnosis
Repollo (<i>Brassica</i> L., <i>B. oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis
Sapote (<i>Calocarpum</i> Pierre. <i>C. sapota</i> (Jacq.) Miller. = <i>C. mammosum</i> (L.) Pierre).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorpho: <i>Colletotrichum gbeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis

Sorgo (<i>Sorghum</i> Moench., <i>S. bicolor</i> (L.) Moench., <i>Sorghum</i> sp.).	<i>Glomerella graminicola</i> Politis. Anamorfo: <i>Colletotrichum graminicola</i> (Ces.) Wils. = <i>Vermicularia graminicola</i> Westend. = <i>Ellisiella mutica</i> Wint. = <i>Colletotrichum sublineola</i> Henn.	Antracnosis, mancha hundida de la nervadura.
Soya (<i>Glycines</i> Willd., <i>G. max</i> (L.) Merr.).	<i>Colletotrichum truncatum</i> (Schwein.) Andrus & Moore. = <i>Colletotrichum caulicola</i> Heald & Wolf. = <i>Colletotrichum glycines</i> Hori. = <i>Colletotrichum viciae</i> Dearn & Overh. Val. <i>Glomerella glycines</i> Lehm. & Wolf. Anamorfo: <i>Colletotrichum destructivum</i> Olgara.	Antracnosis
Tomate (<i>Lycopersicon</i> Mill., <i>L. esculentum</i> Mill., <i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Mill., <i>Lycopersicon</i> sp., <i>Lycopersicon X Lycopersicon</i>).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. = <i>Physalospora cattleyae</i> Maubl. & Lasnier. = <i>Glomerella cinctum</i> Berk. & Curtis. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Colletotrichum phomoides</i> Chester. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Tomate de árbol (<i>Cyphomandra</i> Mart. Ex Sendtn., <i>C. betacea</i> (Cav.) Sendt., <i>Cyphomandra</i> sp.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis, mancha hundida del fruto, paloteo
Totumo (<i>Crescentia</i> L., <i>C. cucurbitina</i> L., <i>C. cujete</i> L.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. = <i>Gloeosporium</i> Desmaz. & Mont.	Antracnosis
Vainilla (<i>Vanilla</i> Mill., <i>V. planifolia</i> Andr.).	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & Schrenk. Anamorfo: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	Antracnosis
Yuca (<i>Manihot</i> Mill., <i>M. esculenta</i> Crantz. = <i>M. utilissima</i> Pohl.).	<i>Colletotrichum</i> Corda.	Antracnosis en ramas
Zanahoria- semillas (<i>Daucus</i> L., <i>D. carota</i> L.).	<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove.	

Fuente: Buriticá, 1999.

ANEXO 2. Procedimiento para la calibración del ocular micrométrico.

El procedimiento se realizó según la metodología descrita por Barthelemy; Dawson y Lee (1984) y French y Hebert, (1982).

Los detalles para la calibración del ocular micrométrico se registran a continuación:

La determinación del tamaño de las conidias se realizó comparando la dimensión de éstas con una escala calibrada. Esta escala consiste en un pequeño disco de cristal con líneas finamente gravadas y espaciadas de manera uniforme, el cual se coloca en el ocular del microscopio. Dicho disco recibe el nombre de ocular micrométrico. Como los microscopios tienen diferencias de aumento al pasar de un objetivo a otro, se calibra el ocular micrométrico con el microscopio a usar y con los objetivos que se usarán. Para esta calibración se utilizó una reglilla micrométrica u objetivo micrométrico marca Graticules Ltda. Tonbridge, Kent., la cual es similar a una lámina portaobjetos, dicha reglilla tiene gravadas 100 divisiones que representan medidas exactas. Comúnmente se usa una reglilla micrométrica cuya escala métrica es de 1 mm. (1.000 micras) dividida en 10 unidades con 10 subdivisiones de 10 micras cada una. Para la determinación de los valores micrométricos se procedió de la siguiente forma: 1) Se colocó el ocular micrométrico al microscopio; 2) Se ubicó la reglilla micrométrica sobre la platina del microscopio y se enfocó a través del microscopio; 3) Se giró el ocular micrométrico hasta que las dos escalas estuvieron paralelas; 4) Se desplazó la reglilla micrométrica hasta que el comienzo (extremo izquierdo) de su escala coincidió con el de la escala del ocular micrométrico; 5) Con base en la distancia conocida entre las líneas de la reglilla micrométrica se calculó en micras la distancia real entre las líneas del ocular micrométrico; 6) El cálculo del valor micrométrico (VM) en micras se realizó con la ayuda de la siguiente fórmula:

$$VM = \frac{\text{Medida micrométrica de platina en micras}}{\text{Unidades micrométrico ocular}}$$

El cálculo se repitió para cada uno de los objetivos usando aceite para el objetivo de inmersión (100 X).

Para la medición de las conidias se procedió a hacer coincidir un extremo o división mayor de la escala del ocular micrométrico con un extremo de la conidia a medir (se giró el ocular para poner la escala paralela al eje a medir). Luego se contó el número de unidades representadas y se multiplicó este valor por el VM correspondiente al objetivo usado. La cifra resultante es la longitud en micras de la conidia.

ANEXO 3. Procedimiento para la elaboración de los de microcultivos.

La técnica utilizada es referenciada por Dhingra y Sinclair (1985); el procedimiento se ajusto para su aplicación conllevando el desarrollo de los siguientes pasos:

1. En una caja de Petri se colocó un papel de filtro cubriendo el fondo de la caja, luego un bastonete de vidrio, una lámina portaobjetos y una laminilla cobreobjetos. Se tapó la caja y se colocó a esterilizar en olla autoclave por 15 min a 121°C y 15 p.s.i (libras de presión/pulgada cuadrada).
2. Se preparó medio de cultivo Agar-agua al 15/1000 (agar producto comercial de la Oxoid, el cual es una sustancia a base de algas marinas) o PDA (medio comercial de la Merck, cuya composición por litro de agua es infusión de 200 g de papas, D(+) glucosa 20 g y agar-agar 15 g), y se sirvió cada caja de Petri con 10 mL de este, procurando que la lámina del medio de cultivo tuviera un espesor de aproximadamente 0.3 cm.
3. De manera aséptica se cortó un cuadro del medio (PDA o Agar-agua) de 1 cm x 1 cm y se colocó en la lámina portaobjeto que se encontraba dentro de la caja de Petri (Preparada en el primer paso).
4. Luego, con la ayuda de un asa recta estéril, se inoculó el hongo en los bordes de cada uno de los lados del cuadro de medio de cultivo (PDA o agar agua).
5. Se cubrió el cuadro del medio (PDA o Agar-agua) ya inoculado, con una laminilla cobreobjetos estéril.
6. Se adicionó agua destilada estéril sobre el papel de filtro, hasta humedecerlo.
7. Se tapó y se selló la caja con papel parafinado y se colocó a incubar a 17°C.

8. Se realizaron y registraron observaciones diariamente.

Anexo 4. ANOVA y prueba de Duncan para la variable diámetro de las lesiones de Antracnosis en frutos de tomate de árbol y manzano a los 22 días de la inoculación.

ANOVA

The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
AISLAMIENTO	18	H1A1 H1A10 H1A11 H1A12 H1A13 H1A14 H1A15 H1A16 H1A17 H1A18 H1A2 H1A3 H1A4 H1A5 H1A6 H1A7 H1A8 H1A9

Number of observations 180

The GLM Procedure

Dependent Variable: LESION

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	638.6122778	37.5654281	1835.78	<.0001
Error	162	3.3150000	0.0204630		
Corrected Total	179	641.9272778			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LESION Mean
0.994836	2.446905	0.143049	5.846111

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AISLAMIENTO	17	638.6122778	37.5654281	1835.78	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AISLAMIENTO	17	638.6122778	37.5654281	1835.78	<.0001

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for LESION

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 162
 Error Mean Square 0.020463

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Critical Range	.1263	.1330	.1374	.1407	.1432	.1452	.1470	.1484	.1497
Number of Meas	11	12	13	14	15	16	17	18	
Critical Range	.1508	.1517	.1526	.1534	.1541	.1547	.1553	.1558	

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AISLAMIENTO
A	11.76000	10	H1A17
B	9.41000	10	H1A15
C	6.84000	10	H1A11
D	6.54000	10	H1A16
E	5.90000	10	H1A18
F	5.76000	10	H1A13
F	5.75000	10	H1A14
G	5.57000	10	H1A9
H	5.51000	10	H1A10
H	5.41000	10	H1A8
H	5.41000	10	H1A8
I	5.26000	10	H1A1
I	5.23000	10	H1A4
J	4.83000	10	H1A6
J	4.73000	10	H1A12
K	4.59000	10	H1A3
L	4.15000	10	H1A7
L	4.06000	10	H1A5
M	3.93000	10	H1A2

Anexo 5. ANOVA y prueba de Duncan para la variable diámetro de lesiones de Antracnosis en frutos de manzano a los 22 días de la inoculación (datos sin transformar).

```

The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
AISLAMIENTO    6      H2A19 H2A20 H2A21 H2A22 H2A23 H2A24

Number of observations    60
    
```

```

The GLM Procedure
Dependent Variable: LESION

Source          DF          Sum of Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model           5          23.64483333          4.72896667       11.37        <.0001
Error          54          22.46100000          0.41594444
Corrected Total 59          46.10583333

R-Square      Coeff Var      Root MSE      LESION Mean
0.512838      14.46589      0.644938      4.458333

Source          DF          Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
AISLAMIENTO     5          23.64483333          4.72896667       11.37        <.0001

Source          DF          Type III SS      Mean Square      F Value      Pr > F
AISLAMIENTO     5          23.64483333          4.72896667       11.37        <.0001
    
```

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for LESION

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 54
 Error Mean Square 0.415944

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	.5783	.6082	.6280	.6423	.6534

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AISLAMIENTO
A	5.1700	10	H2A24
A	4.9100	10	H2A22
B	4.7700	10	H2A19
B	4.5000	10	H2A21
B	4.1500	10	H2A20
B	3.2500	10	H2A23

Continuación Anexo 5

ANOVA y prueba de Duncan para la variable diámetro de lesiones de Antracnosis en frutos de manzano a los 22 días de la inoculación (datos transformados).

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
AISLAMIENTO	6	H2A19 H2A20 H2A21 H2A22 H2A23 H2A24

Number of observations 60

The GLM Procedure

Dependent Variable: LESION

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.13633901	0.22726780	7.67	<.0001
Error	54	1.59967807	0.02962367		
Corrected Total	59	2.73601709			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LESION Mean
0.415326	10.26310	0.172115	1.677030

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AISLAMIENTO	5	1.13633901	0.22726780	7.67	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AISLAMIENTO	5	1.13633901	0.22726780	7.67	<.0001

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for LESION

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 54
 Error Mean Square 0.029624

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	.1543	.1623	.1676	.1714	.1744

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AISLAMIENTO
A	1.81301	10	H2A24
A	1.77413	10	H2A22
B	1.74721	10	H2A19
B	1.69863	10	H2A21
B	1.63198	10	H2A20
B	1.39722	10	H2A23
C			

Continuación Anexo 5.

NORMALIDAD Manzano TRANSFORMADA

NOTA:La transformación que se hizo para que los datos se ajusten a una distribución normal fue: $Y=LN(X+0.99)$

Tests for Normality

Test	--Statistic--		-----p Value-----	
Shapiro-Wilk	W	0.689906	Pr < W	<0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D	0.181481	Pr > D	<0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.51976	Pr > W-Sq	<0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	3.25719	Pr > A-Sq	<0.0050

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
100% Max	0.28728
99%	0.28728
95%	0.18998
90%	0.14569

The UNIVARIATE Procedure
Variable: RESIDU

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
75% Q3	0.05939
50% Median	0.01293
25% Q1	-0.04201
10%	-0.14087
5%	-0.17351
1%	-0.99842
0% Min	-0.99842

Extreme Observations

-----Lowest-----		-----Highest-----	
Value	Obs	Value	Obs
-0.99842	47	0.15812	11
-0.22348	12	0.18998	41
-0.18071	2	0.18998	45
-0.16631	52	0.18998	50
-0.15323	30	0.28728	44

The UNIVARIATE Procedure
 Fitted Distribution for RESIDU

Parameters for Normal Distribution

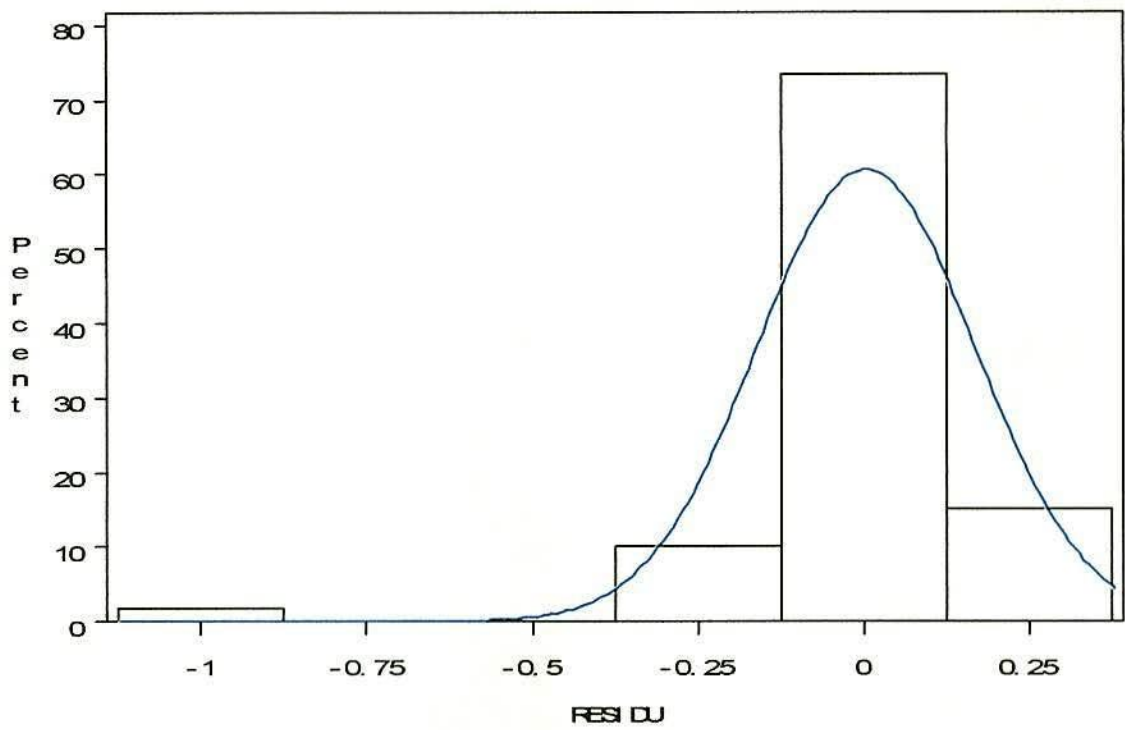
Parameter	Symbol	Estimate
Mean	Mu	0
Std Dev	Sigma	0.164661

Goodness-of-Fit Tests for Normal Distribution

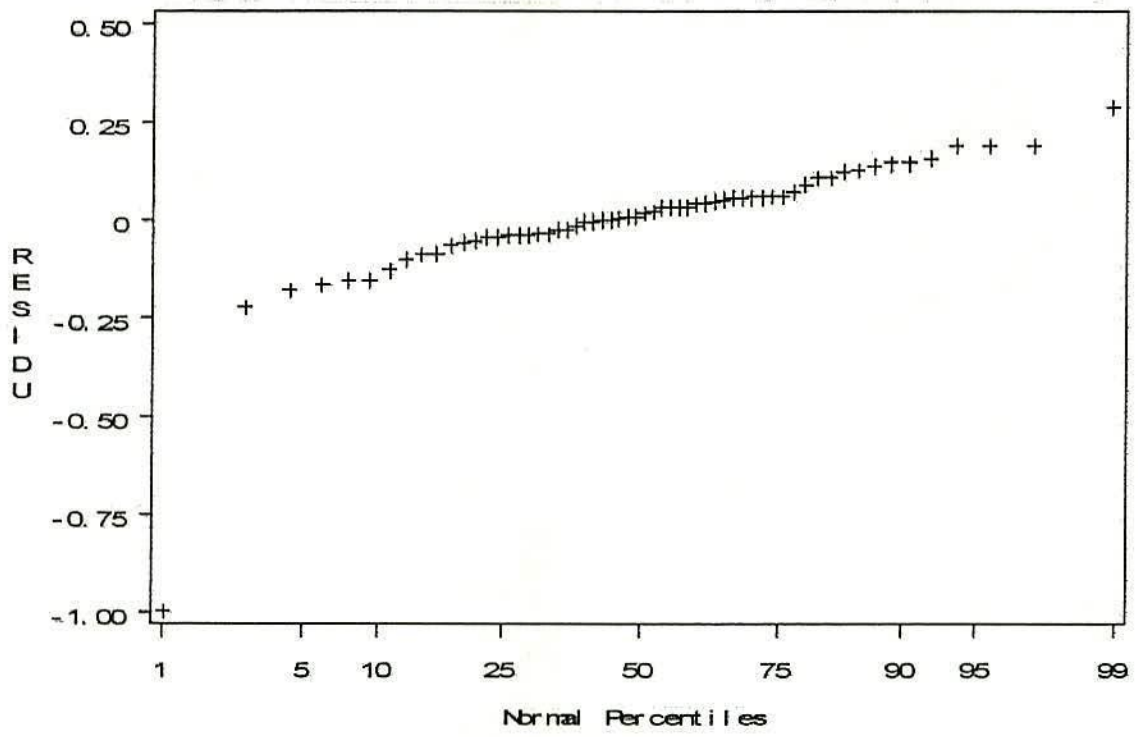
Test	---Statistic---	-----p value-----
Kolmogorov-Smirnov	D 0.18148099	Pr > D <0.010
Cramer-von Mises	W-Sq 0.51975996	Pr > W-Sq <0.005
Anderson-Darling	A-Sq 3.25719024	Pr > A-Sq <0.005

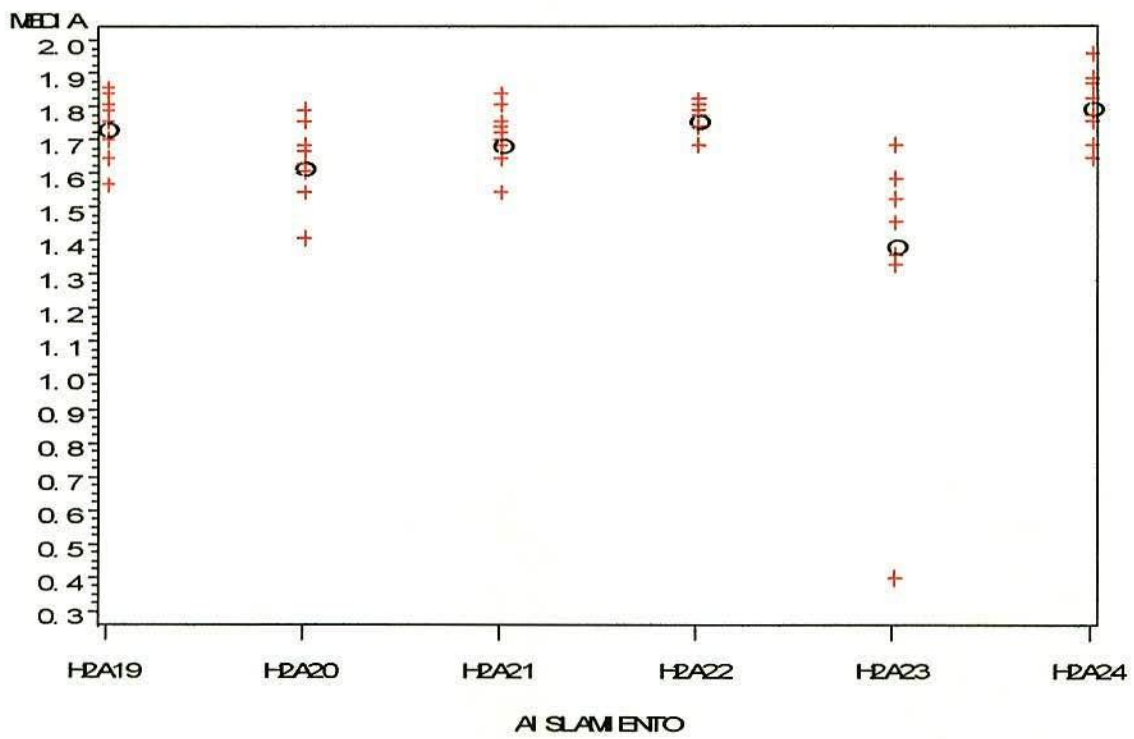
Quantiles for Normal Distribution

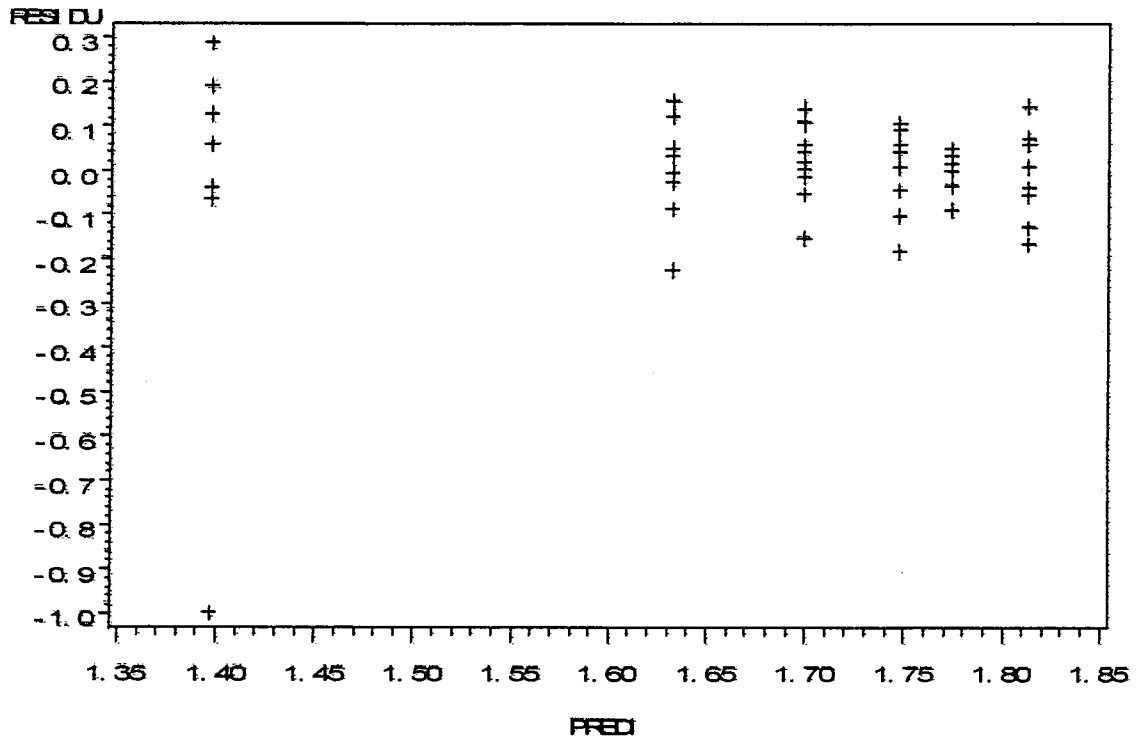
Percent	-----Quantile-----	
	Observed	Estimated
1.0	-0.99842	-0.383058
5.0	-0.17351	-0.270843
10.0	-0.14087	-0.211021
25.0	-0.04201	-0.111062
50.0	0.01293	-0.000000
75.0	0.05939	0.111062
90.0	0.14569	0.211021
95.0	0.18998	0.270843
99.0	0.28728	0.383058



BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA







Anexo 6. Análisis de varianza para la variable Tasas de crecimiento (cm/día) y pruebas de comparación de Dunkan y tukey.

**Analysis of Variance Procedure (ANOVA)
Class Level Information**

Class	Levels	Values
AISL	33	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

Number of observations in data set = 330

Analysis of Variance Procedure (ANOVA)

Dependent Variable: TASA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	32	1.22270700	0.03820959	2.29	0.0002
Error	297	4.95265604	0.01667561		
Corrected Total	329	6.17536304			

R-Square	C.V.	Root MSE	TASA Mean
0.197998	53.90517	0.12913408	0.23955788

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AISL	32	1.22270700	0.03820959	2.29	0.0002

**Analysis of Variance Procedure (ANOVA)
Duncan's Multiple Range Test for variable: TASA**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 297 MSE= 0.016676

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Critical Range	.1137	.1196	.1236	.1266	.1289	.1308	.1324	.1337	.1348	.1359	.1368
Number of Means	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Critical Range	.1376	.1383	.1390	.1396	.1401	.1406	.1411	.1415	.1419	.1423	.1427
Number of Means	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
Critical Range	.1430	.1433	.1436	.1439	.1442	.1444	.1447	.1449	.1451	.1453	

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	AISL
	A	0.31857	10	12
	A			
B	A	0.31379	10	18
B	A			
B	A	0.31199	10	14
B	A			
B	A	0.31133	10	11
B	A			
B	A	0.30582	10	13
B	A			
B	A	0.30321	10	15
B	A			
B	A	0.30176	10	6
B	A			
B	A	0.30136	10	9
B	A			
B	A	0.29212	10	5
B	A			
B	A	0.28767	10	16
B	A			
B	A	0.28535	10	2
B	A			
B	A	0.28434	10	33
B	A			
B	A	0.27860	10	4
B	A			
B	A	0.27859	10	22
B	A			
B	A	0.26958	10	25
B	A			
B	A	0.26624	10	3
B	A			
B	A	0.25565	10	10
B	A			
B	A	0.24143	10	26
B	A			
B	A	0.23860	10	24
B	A			
B	A	0.21614	10	1
B	A			
B	A	0.21037	10	31
B	A			
B	A	0.20795	10	7
B	A			
B	A	0.20171	10	19
B	A			
B	A	0.19439	10	17
B	A			
B	A	0.18855	10	29
B	A			
B	A	0.18306	10	8
B	A			
B	A	0.17930	10	32
B	A			
B	A	0.17317	10	23
B	A			
B	A	0.16176	10	21
B	A			
B	A	0.15780	10	30
B	A			
B	A	0.14151	10	27
B	A			
B	A	0.12959	10	28
B	A			
B	A	0.11411	10	20

Analysis of Variance Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: TASA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 297 MSE= 0.016676
 Critical Value of Studentized Range= 5.422
 Minimum Significant Difference= 0.2214

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AISL
A	0.31857	10	12
A			
A	0.31379	10	18
A			
A	0.31199	10	14
A			
A	0.31133	10	11
A			
A	0.30582	10	13
A			
A	0.30321	10	15
A			
A	0.30176	10	6
A			
A	0.30136	10	9
A			
A	0.29212	10	5
A			
A	0.28767	10	16
A			
A	0.28535	10	2
A			
A	0.28434	10	33
A			
A	0.27860	10	4
A			
A	0.27859	10	22
A			
A	0.26958	10	25
A			
A	0.26624	10	3
A			
A	0.25565	10	10
A			
A	0.24143	10	26
A			
A	0.23860	10	24
A			
A	0.21614	10	1
A			
A	0.21037	10	31
A			
A	0.20795	10	7
A			
A	0.20171	10	19
A			
A	0.19439	10	17
A			
A	0.18855	10	29
A			
A	0.18306	10	8
A			
A	0.17930	10	32

Tukey Grouping	Mean	N	AI SL
A	0.17317	10	23
A			
A	0.16176	10	21
A			
A	0.15780	10	30
A			
A	0.14151	10	27
A			
A	0.12959	10	28
A			
A	0.11411	10	20

Anexo 7. Análisis de varianza y pruebas de Duncan y Tukey para las variables largo y ancho de conidias.

Analysis of Variance Procedure Class Level Information

Class	Levels	Values
AISL	33	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

Number of observations in data set = 3300

Analysis of Variance Procedure (ANOVA)

Dependent Variable: LARGO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	32	8156.40827273	254.88775852	91.85	0.0001
Error	3267	9066.05180000	2.77503881		
Corrected Total	3299	17222.46007273			
	R-Square	C.V.	Root MSE	LARGO Mean	
	0.473591	14.66037	1.66584477	11.36290909	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AISL	32	8156.40827273	254.88775852	91.85	0.0001

Analysis of Variance Procedure (ANOVA)

Dependent Variable: ANCHO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	32	480.07469697	15.00233428	49.79	0.0001
Error	3267	984.33020000	0.30129483		
Corrected Total	3299	1464.40489697			
	R-Square	C.V.	Root MSE	ANCHO Mean	
	0.327829	11.71111	0.54890329	4.68703030	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AISL	32	480.07469697	15.00233428	49.79	0.0001

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: LARGO

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 3267 MSE= 2.775039

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Critical Range	.4619	.4864	.5027	.5148	.5243	.5321	.5385	.5441	.5489	.5532	.5569
Number of Means	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Critical Range	.5603	.5634	.5662	.5688	.5712	.5734	.5754	.5773	.5791	.5808	.5823
Number of Means	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
Critical Range	.5838	.5852	.5866	.5879	.5891	.5902	.5913	.5924	.5934	.5943	

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AISL
	15.1740	100	22
	14.9200	100	18
	14.6250	100	30
	13.4350	100	21
	12.8850	100	27
	12.8500	100	19
	12.3000	100	20
	12.2500	100	33
	11.9300	100	9
	11.9000	100	1
	11.8700	100	25
	11.6750	100	11
	11.6570	100	13
	11.5050	100	28
	11.4000	100	31
	11.3250	100	3
	11.1250	100	29
	10.9500	100	23
	10.8000	100	12
	10.7850	100	6
	10.7500	100	4
	10.6750	100	15
	10.6600	100	5
	10.5600	100	14

Duncan	Grouping	Mean	N	AISL
K	M N	10.4450	100	24
	M N			
	M N	10.4050	100	2
	M N			
Q	M N	10.2050	100	16
O	N	9.9650	100	8
O				
O	P	9.7340	100	7
	P			
	P	9.3750	100	26
	P			
Q	P	9.2550	100	17
Q				
Q	R	8.8510	100	32
	R			
	R	8.7350	100	10

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: ANCHO

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 3267 MSE= 0.301295

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Critical Range	.1522	.1603	.1657	.1696	.1728	.1753	.1775	.1793	.1809	.1823	.1835
Number of Means	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Critical Range	.1846	.1856	.1866	.1874	.1882	.1889	.1896	.1902	.1908	.1914	.1919
Number of Means	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
Critical Range	.1924	.1928	.1933	.1937	.1941	.1945	.1948	.1952	.1955	.1958	

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AISL
	5.09000	100	14
	5.08400	100	33
	5.06000	100	5
B	5.04500	100	6
B	5.04500	100	19
B	5.01200	100	20
B	5.01000	100	2
B	5.00700	100	7
B	5.00000	100	8
B	5.00000	100	10
B	4.99900	100	1
B	4.93600	100	30
B	4.91300	100	22
B D	4.88600	100	31
B D	4.82400	100	21
F D	4.76800	100	17
F D	4.76700	100	9
F D	4.75300	100	11
F D	4.73300	100	3
F I	4.71100	100	27
F I	4.69300	100	12
I	4.64000	100	18
I J	4.58400	100	13
K I J	4.57200	100	4

Duncan Grouping			mean	N	AISL
K	J	L	4.49600	100	23
K		L			
K	M	L	4.42500	100	29
	M	L			
N	M	L	4.36200	100	28
N	M	L			
N	M	L	4.34000	100	25
N	M				
N	M	O	4.28900	100	24
N		O			
N		O	4.20500	100	15
		O			
		O	4.17200	100	26
	P		3.72900	100	16
	Q		3.52200	100	32

Analysis of Variance Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: LARGO

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 3267 MSE= 2.775039

Critical Value of Studentized Range= 5.372

Minimum Significant Difference= 0.8949

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AISL
A	15.1740	100	22
A			
A	14.9200	100	18
A			
A	14.6250	100	30
B	13.4350	100	21
B			
C	12.8850	100	27
C			
C	12.8500	100	19
C			
C			
C	12.3000	100	20
C			
C	12.2500	100	33
F	11.9300	100	9
F			
F	11.9000	100	1
F			
F	11.8700	100	25
F			
F	11.6750	100	11
F			
F	11.6570	100	13
F			
F	11.5050	100	28
H			
H	11.4000	100	31
H			
H	11.3250	100	3
H			
H	11.1250	100	29
H			
H	10.9500	100	23
H			
H	10.8000	100	12
H			
H	10.7850	100	6
H			
H	10.7500	100	4
H			
H	10.6750	100	15
H			
H	10.6600	100	5
L	10.5600	100	14
L			
L	10.4450	100	24
L			
L	10.4050	100	2
L			
L	10.2050	100	16
L			

Tukey Grouping				Mean	N	AI SL
P	N	O	M	9.9650	100	8
P	N	O		9.7340	100	7
P	N	O	Q	9.3750	100	26
P	R	O	Q	9.2550	100	17
P	R		Q	8.8510	100	32
	R		Q	8.7350	100	10

Analysis of Variance Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: ANCHO

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 3267 MSE= 0.301295

Critical Value of Studentized Range= 5.372

Minimum Significant Difference= 0.2949

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AI SL
	5.09000	100	14
	5.08400	100	33
	5.06000	100	5
B	5.04500	100	6
B	5.04500	100	19
B	5.01200	100	20
B	5.01000	100	2
B	5.00700	100	7
B	5.00000	100	8
E	5.00000	100	10
E	4.99900	100	1
E	4.93600	100	30
E	4.91300	100	22
E	4.88600	100	31
E	4.82400	100	21
E	4.76800	100	17
E	4.76700	100	9
E	4.75300	100	11
E	4.73300	100	3
E	4.71100	100	27
J	4.69300	100	12
J	4.64000	100	18
J	4.58400	100	13
M	4.57200	100	4
M	4.49600	100	23
M	4.42500	100	29
M	4.36200	100	28

Tukey Grouping			Mean	N	AI SL
M	L	O	4.34000	100	25
M		O	4.28900	100	24
M		O	4.20500	100	15
		O	4.17200	100	26
		P	3.72900	100	16
		P	3.52200	100	32

ANEXO 8. Principales aspectos taxonómicos biológicos y morfológicos de *Colletotrichum acutatum*.

El hongo *Glomerella acutata* Guerber & Correll., es mas conocido por su anamorfo *Colletotrichum acutatum* Simmonds, el cual se distingue de otras especies de *Colletotrichum*, principalmente porque algunas de sus conidias son agudas en ambos extremos y relativamente estrechas (menos de 5 μ de ancho), sin embargo, la forma y el tamaño de las conidias son características variables y no son fácilmente distinguibles de las de *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding. & von Schrenk (anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig.) (OEPP/EPPO, 2004).

El telemorfo de *C. acutatum* ha sido observado *in vitro*, pero no ha sido encontrado en condiciones naturales (OEPP/EPPO, 2004; Wharton y Diéguez, 2004). El estado sexual del hongo se registró en 1997 y en el año 2001 se describió la especie *Glomerella acutata* la cual se obtuvo en cultivos artificiales, bajo condiciones de laboratorio, mediante el cruzamiento de diferentes aislamientos de *C. acutatum*; esto indicó que la especie era heterotálica; pero en 1999 se reportó la producción del estado sexual a partir de un monospórico de *C. acutatum*, sugiriendo también la existencia de aislamientos homotálicos dentro de la especie (Vinnere, 2004). Guerber y Correll (1997), registraron aislamientos de *C. acutatum* de manzano produciendo peritecios en cultivos artificiales sobre un medio de agar con sales, bajo condiciones de luz continua.

En la actualidad el hongo se identifica como *Glomerella acutata* Guerber & Correll., anamorfo: *Colletotrichum acutatum* Simmonds., sinónimo *Colletotrichum xanthii* Halsted. Dicho hongo se encuentra ubicado

taxonómicamente como Fungi; Ascomycota; Phyllachorales (OEPP/EPPO, 2004).

Las principales características morfológicas de *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds, son: **colonias**; blancas que se tornan naranja pálido, luego gris - verdosas o negras y por el reverso de color rosado a rojo púrpura (Gunnell y Douglas, 1992; Diko y Mordeu, 1979). Sutton (1992), menciona que la especie *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds se caracteriza por poseer colonias blancas que se toman de colores grises a café oscuro.

Sutton (1980), define a las colonias de *C. acutatum* Simmonds, como densas, micelio aéreo blanco, gris rosado suave, conidias en masas salmón rosado, esclerocios ausentes, setas ausentes, conidias fusiformes con dimensiones 8.5-16.5 X 2.5-4 μ , ocasionalmente con ligera constricción. Según OEPP/EPPO (2004) en cultivo sobre PDA, *C. acutatum* Simmonds produce colonias gris claro, y ocasionalmente rosadas.

Förster & Adaskaveg (1999, citados por Wharton y Diéguez, 2004), encontraron en almendro dos fenotipos de *C. acutatum*, uno de colonias grises y otro rosado, por lo tanto se sugiere tener precaución cuando se usa ésta característica para separar las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.

Vinnere (2004), encontró que el color de la colonia en algunos aislamientos podía variar y que algunos aislamientos inicialmente rosados mas tarde se tornaban color vino rojo, otros variaban de gris claro a oscuro y nunca producían

pigmentación rosada. De acuerdo con la producción de pigmento la forma rosada de *C. acutatum* ha sido separada y se conoce como. *C. acutatum* f. sp. *Chromogenum* según Simmonds (1965); Hindorf (1970); Baxter, van der Westhuizen & Eicker (1983) citados por Vinnere (2004).

Diko y Mordeu (1979), describen el micelio del hongo (*C. acutatum* Simmonds ex Simmonds) como superficial e inmerso, ramificado, septado, hialino a castaño oscuro. Los conidióforos son de apariencia hialina, septados y ramificados frecuentemente cerca a la base. Los conidióforos emergen de las células superiores del conidiomata. Las células conidiogénicas se presentan en fiálides, y son hialinas, lisas y cilíndricas. Las conidias son hialinas, aseptadas, rectas, lisas, fusiformes y se presentan en masas de color salmón (Diko y Mordeu, 1979).

Las dimensiones de las conidias de *C. acutatum* son variables registrándose en la literatura los siguientes valores:

8 -16 x 2.5 - 4 μ . Diko y Mordeu (1979)

8.5 -16.5 x 2.5 - 4 μ . Sutton (1992)

8 -16 (20) x 2.5 -5 μ . OEPP/EPPO (2004)

8.5 -16.5 X 2.5 - 4 μ . Sutton (1980)

8.3 -14.4 x 2.5 - 4 μ . Simmonds, (1965 citado por Vinnere, 2004)

12.3 - 14.7 x 4.4 - 5.3 μ . Simth & Black, (1990, citados por Vinnere, 2004)

10 - 18 x 2.5 - 4.5 μ * Walker, Nikandrow & Millar (1991, citados por Vinnere, 2004)

12.5 - 20(22.5) x 3 - 5 μ . Gunnel & Gubler (1992, citados por Vinnere, 2004)

10 x 3.5 μ .** Vinnere *et al.* (sf., citados como investigación I por Vinnere, 2004)

11 - 15.5 x 3.5 - 4 μ ***Vinnere *et al.*(sf., citados como investigación I por Vinnere, 2004)

10 - 22.5 x 3 - 5.5 μ Vinnere *et al.*(sf., citados como investigación I y IV por Vinnere, 2004)

*. Subcultivo vivo del holotipo.** Aislamiento seco del holotipo.*** Aislamiento seco del paratipo.

Según Wharton y Diéguez (2004), éste caracter esta influenciado por el medio de cultivo; por ejemplo, aislamientos de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* cultivados sobre agar guisante presentan traslape en su tamaño conidial, indicando que esta característica no es confiable para poder diferenciar estas especies (Wharton y Diéguez, 2004). También, respecto a la forma ocurren casos como el de la fresa, en el que ocasionalmente las conidias de *C. acutatum* tienen los extremos menos puntiagudos y mas redondeados tendiendo a parecerse a las de *C. gloeosporioides* (OEPP/EPPO, 2004).

Los **Apresorios** son de color castaño claro a medio, poco abundantes, en forma de cuña o huevo, márgenes lisos; se forman en hifas indiferenciadas y miden entre 6.5 –11 x 4.5-7.4 μ (Diko y Mordeu, 1979).

Sobre sustrato natural se presenta el **acérvulo** subcuticular–superficial, con dehiscencia irregular y un diámetro mayor a 0.5mm. (Diko y Mordeu, 1979). El hongo no presenta setas o raramente las produce (Gunnell y Douglas, 1992). En las colecciones que presentan **setas**, éstas son de color castaño, lisas, septadas, rectas a ligeramente curvadas, ahusadas hacia los ápices, con dimensiones 46.5-85 x 3-4 μ . (Diko y Mordeu, 1979).

C. acutatum Simmonds, según Pérez (1993), es un hongo cuya única diferencia respecto a *C. gloeosporioides* es que presenta además de las conidias normales, algunos agudos en ambos extremos y en general más angostos (2.5 μ de diámetro). Según Diko y Mordeu (1979), este hongo difiere de *G. cingulata* en el

color de la colonia y en la morfología de la conidia. (rosado – naranja y conidia fusiforme en *C. acutatum*).

C. acutatum Simmonds, es de amplia distribución mundial registrándose principalmente en la **región EPPO**: Bélgica, Francia, Israel (sin confirmar), Italia, países bajos, Portugal (sin confirmar), España, Suiza (sin confirmar) y Reino Unido; **Asia**: China (Hainan, Hubei) Hong Kong, India (Punjab), Indonesia, Israel (sin confirmar) Japón (Honshu), Republica de Corea, Malasia, Sri Lanka y Tailandia; **África**: Etiopía, Kenya, Nigeria, Sur África, Tanzania, Zimbabwe; **Norte América**: Canadá (British Columbia), USA (California, Connecticut, Florida, Mississippi, Missouri, Carolina, Ohio, Oklahoma); **América Central y del Caribe**: Costa Rica y Republica Dominicana; **Sur América**: Brasil, Colombia, Ecuador; **Oceanía**: Australia (New South Wales, Queenslans, Victoria) y Nueva Zelanda. En **Estados Unidos**, también se encuentra presente (CABI/EPPO, 1994).

Este patógeno se registra en un amplio rango de hospedantes principalmente en fresa (*Fragaria ananassa*), donde causa pudrición del fruto conocida como mancha negra; en este cultivo el hongo reviste importancia económica y fitosanitaria (OEPP/EPPO, 2004; CABI/EPPO, 1994; Bosshard, 1997). El hongo también se registra en manzano (*Malus* sp.), anemone (*Anemone coronaria*), lupino (*Lupinus* spp.), pino (*Pinus* spp.) (OEPP/EPPO, 2004; Vinnere, 2004), papaya (*Carica papaya*), aguacate (*Persea americana*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), nuez de nogal (*Juglans regia*), frijol dulce (*Lathyrus odoratus*), veza (*Vicia* spp.), café (*Coffea arabica*), mango (*Mangifera indica*), en el genero *Rhododendron* (Vinnere, 2004), mortiño (*Vaccinium* spp.), almendro (*Prunus dulcis*), durazno (*Prunus persica*), cítricos (*Citrus* spp.), olivo (*Olea europea*), aguacate (*Persea* spp.), fresa (*Fragaria x ananasa*) (Wharton y Diéguez, 2004);

también en manzano (*Malus pumila*), aubergines (*Solanum melongena*), apio (*Apium graveolens*), guayaba (*Psidium guajava*), pino (*Pinus elliottii* y *Pinus radiata*), tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*), ají (*Capsicum annum*), *Camellia* spp., *Ceanothus* spp., *Tsuga heterophylla*, *Zinnia* spp. (CABI/EPPO, 1994), y en pequiizeiro (*Caryocar brasiliense*) (Anjos, Charchar y Akimoto, 2002).

Anjos, Charchar y Akimoto (2002) relacionan 18 especies de plantas pertenecientes a 14 familias botánicas diferentes, que son infectadas y desarrollan síntomas de Antracnosis cuando son inoculadas con *C. acutatum* proveniente de pequiizeiro. También se ha comprobado que *C. acutatum* de fresa sobrevive y prolifera en plantas de tomate, berenjena, pimienta y frijol sin causarles ningún síntoma (Freeman, Horowitz y Sharon, 2002).

Debido a la alta agresividad de *C. acutatum* y a las pérdidas que ocasiona en campo en muchos cultivos, es considerado objeto de cuarentena en muchos países (Vinnere, 2004).

C. acutatum, fue descrito originalmente en Australia por Simmons en 1965, como agente causante de pudrición de frutos de fresa, papaya y tomate; pero en ese tiempo no se le designó un tipo. Para 1968, fue designado un holotipo, el cual validó el nombre (Diko y Mordeu, 1979; Vinnere, 2004). Entre los años 1965-1980 se publicaron pocos artículos al respecto, orientándose la mayoría de ellos a reportar el taxon en nuevos hospedantes y sitios geográficos. Gracias a la aplicación de métodos moleculares para la caracterización de aislamientos de hongos se produjeron abundantes artículos sobre la caracterización de *C. acutatum* y su diferenciación de *C. gloeosporioides* al comienzo de los años 90s.

Sin embargo, a la fecha, a pesar de estos estudios, aún permanecen pendientes por responder muchas preguntas acerca de *C. acutatum* (Vinnere, 2004).

Los estudios han demostrado la existencia de una amplia diversidad genética y heterogeneidad dentro de la especie. Una hipótesis para la existencia de esta diversidad, es la ocurrencia de recombinación sexual entre aislamientos del hongo (Wharton y Diéguez, 2004). Además, se ha encontrado que aislamientos de *C. acutatum* de un mismo hospedante son autoestériles; pero ocurre cruzamiento entre aislamientos del hongo procedentes de diferentes hospedantes, los cuales producen fácilmente el telemorfo *G. acutata*. Otros mecanismos por los que se puede generar diversidad genética, en poblaciones de *C. acutatum*, es mediante la compatibilidad vegetativa. Los estudios indican que la genética sexual y la compatibilidad vegetativa en *C. gloeosporioides* y en *C. acutatum* son bastante similares, sin embargo, muchos aspectos se deben resolver en *C. acutatum* teniendo en cuenta la genética sexual, la compatibilidad vegetativa y los efectos de estos mecanismos sobre la estructura poblacional (Wharton y Diéguez, 2004).

Entre 1997 y 1999, un grupo de investigadores de Nueva Zelanda llevaron a cabo dos extensos estudios sobre diferentes grupos morfológicos reconocidos dentro de *C. acutatum*, y por primera vez usaron los términos *C. acutatum sensu lato* y *C. acutatum sensu stricto* Simmons, reconociendo a *C. acutatum* como grupo de especies Johnston & Jones (1977); Lardner *et al.* (1999, citados por Vinnere, 2004). Estos estudios emplearon análisis morfológicos y moleculares que permitieron dividir *C. acutatum sensu lato* en siete grupos biológicos diferentes; y también por primera vez se referencia la estrecha relación existente entre *C. acutatum* y *Glomerella miyabeana*, permitiendo sugerir que éste podría ser el telemorfo de uno de los grupos reconocidos dentro de *C. acutatum sensu lato*.

Lardner *et al.* (1999) y Johnston (2000, citados por Vinnere 2004), consideran que algunos de los grupos biológicos existentes dentro de *C. acutatum* podrían considerarse como taxas separadas, pero aún debe decidirse si son especies separadas o subespecies.

Sreenivasaprasad *et al.* (1996) y Johnston & Jones (1977, citados por Vinnere, 2004), han planteado la posibilidad de que *C. acutatum sensu lato* puede ser dividido en por lo menos dos especies diferentes debido a la excepcionalmente alta variación dentro de la región ITS. Más tarde Lardner *et al.* (1999, citados por Vinnere, 2004), sugirieron que los grupos biológicos podrían ser considerados como taxas separadas; pero no propusieron segregarlos en nuevas especies.

Los estudios recientes sobre la sexualidad de *C. acutatum* y el secuenciamiento de múltiples loci de numerosos aislamientos de *G. miyabeana* llevados a cabo por Guerber & Correll (2001) y por Vinnere & Fatehi (documento mecanografiado s.f, citados por Vinnere, 2004), proveen bases para especular acerca de la razón para la existencia de dos grupos así: *G. miyabeana* podría ser un grupo junto con los aislamientos homotáticos de Letonia y Nueva Zelanda y otros donde el telemorfo jamás ha sido observado; y el otro grupo estaría compuesto por *G. acutata* y los aislamientos presumiblemente heterotáticos que producen el telemorfo en los cruzamientos en laboratorio junto con el holotipo de *C. acutatum*; esto aún permanece para los árboles filogenéticos obtenidos de los loci secuenciados según Vinnere & Fatehi (documento mecanografiado s.f, citados por Vinnere, 2004). Estos investigadores también registran que los aislamientos de *G. acutata* tienen morfología similar a *C. acutatum sensu* Simmonds.; mientras que *G. miyabeana* corresponden a los llamados "aislamientos con morfología intermedia"; lo cual podría ser una base para separar a *C. acutatum sensu lato* en dos

especies. En tal situación los mismos investigadores plantean dos posibles soluciones que tienen que ver con la definición de especies en *C. acutatum*; la **primera** solución, consiste en aceptar el nivel actual de variación morfológica y genética existente dentro de *C. acutatum sensu lato*, considerando prioritariamente el nombre de *G. miyabeana* como único telemorfo de *C. acutatum sensu lato*; *G. acutata*, podría ser considerado un sinónimo, y todos los grupos biológicos reconocidos dentro de *C. acutatum sensu lato* podrían ser tratados a nivel de subespecies; esto fundamentado en estudios existentes en otras especies de *Glomerella* (*G. cingulata* y *G. graminicola*), las cuales poseen el fenómeno de heterotalismo desbalanceado, en el que poblaciones homotáticas y heterotáticas pueden estar presentes dentro de las especies. Para el caso de *C. acutatum* se requiere una cuidadosa consideración debido a que la gran variación genética y biológica existente en *C. acutatum sensu lato* es mayor que la usualmente aceptada para las especies de *Colletotrichum*. Otra propuesta consiste en separar *C. acutatum sensu lato* por lo menos en dos especies biológicas a saber: 1). *C. acutatum sensu* Simmonds con *G. acutata* como su telemorfo y 2). *G. miyabeana* como telemorfo de los aislamientos reconocidos como “*C. acutatum* con morfología conidial intermedia”; con esta propuesta la posición taxonómica de los aislamientos homotáticos de *C. acutatum sensu lato* permanecería sin resolver a causa de que el telemorfo de estos aislamientos es genéticamente diferente de *G. miyabeana* y *G. acutata* Vinnere & Fatehi (documento mecanografiado s.f., citados por Vinnere, 2004). Posiblemente estos aislamientos podrían ser descritos como especies separadas (Vinnere, 2004).

En la **segunda** solución, *C. acutatum sensu* Simmonds, puede recuperar su significado y estatus original, terminándose la confusión. Sin embargo, los resultados presentados por el equipo científico de Vinnere (relacionados con el agente causal de Antracnosis en plantas del género *Rhododendron*, y el

documento manuscrito sobre *G. miyabeana*), y los estudios de Sreenivasaprasad *et al.* (1996), Johnston & Jones (1977), Lardner *et al.* (1999) y Guerber & Correll, (2001, citados por Vinnere, 2004), sugieren fuertemente la redefinición de *C. acutatum*, y se espera que con la gradual acumulación de información acerca del genoma de *Colletotrichum* y la futura comparación de los genomas completos de las diferentes especies se pueda contribuir a entender lo que es una definición de especies aplicable a este género.

En un estudio llevado a cabo por Freeman *et al.* (2001), fueron caracterizados por métodos moleculares e identificación morfológica aislamientos de *C. acutatum sensu* Simmonds, de varios hospedantes y diferentes regiones geográficas, encontrándose considerable diversidad genética que permitió identificar cuatro subgrupos saber: el subgrupo I, que incluye aislamientos de almendro, manzano, durazno y pacana (pecan); el subgrupo II, conformado por aislamientos de anemone, olivo y fresa; el subgrupo III, con aislamientos de almendro (de Israel) y fresa (de España) y el subgrupo IV, que contiene un solo aislamiento de anemone de los países bajos.

Con relación a la biología de *C. acutatum*, las conidias del hongo germinan para formar un apresorio sobre la superficie de la planta, el cual produce una hifa que penetra y se desarrolla dentro de las células de la planta (CABI/EPPO, 1994), ocasionando infecciones en órganos como raíces, hojas, flores, ramas tiernas, frutos y causando enfermedades como pudrición de la corona y las raíces, defoliación, añublo floral y pudrición de frutos (Wharton y Diéguez, 2004). La corona por su microclima húmedo es a menudo muy propensa para el desarrollo de la enfermedad (CABI/EPPO, 1994).

Los estudios sobre la penetración y colonización de los tejidos del hospedante por *C. acutatum* indican que la estrategia adoptada por el hongo depende del hospedante; sobre estolones y hojas de fresa el hongo actúa como subcuticular, intramural necrótrofo con estado biótrofo no detectable; mientras que en mortiño (blueberry) y almendro el hongo adopta las dos estrategias de infección (intracelular hemibiótrofo y subcuticular intramural necrótrofo). Este hongo puede cambiar la estrategia de infección cuando coloniza diferentes tejidos del hospedante o diferentes cultivares, por ejemplo, en almendro se comporta de manera diferente cuando infecta pétalos y cuando infecta hojas. En mortiño, actúa como intracelular hemibiótrofo cuando infecta frutos maduros de cultivares susceptibles; pero cuando infecta frutos maduros del cultivar resistente "Elliot" actúa como subcuticular intramural necrótrofo (Wharton y Diéguez, 2004).

En condiciones adecuadas el hongo puede crecer rápidamente dentro de la planta y causar síntomas severos, sin embargo, existen circunstancias en las que puede ser quiescente permaneciendo entre los tejidos por cierto periodo; y en otros casos el hongo solamente llega a aparecer después de la cosecha (CABI/EPPO, 1994).

Cuando el hongo se ha desarrollado suficientemente dentro de la planta se producen los cuerpos fructíferos ocasionando los síntomas típicos de la Antracnosis (CABI/EPPO, 1994); las conidias se forman libremente y son dispersadas por el salpique del agua (Diko y Mordeu, 1979; CABI/EPPO, 1994), éstas pueden permanecer latentes en el suelo por algún tiempo, sobreviviendo por mas tiempo bajo condiciones de frío y sequía. El hongo también puede permanecer viable por largos periodos en plantas muertas sobre la superficie o en el material enterrado en el suelo. Además de las conidias, los apresorios y los

fragmentos de hifas también pueden jugar un papel importante en la dispersión del hongo, sin embargo, la diseminación a larga distancia se debe a la influencia de los humanos al transportar materiales infectados (CABI/EPPO, 1994).

Respecto a la epidemiología, se considera que en la mayoría de las enfermedades ocasionadas por *Colletotrichum* spp., las conidias germinan en presencia de agua, produciendo infecciones quiescentes que predominan en los periodos mas húmedos de la estación de crecimiento; en aguacate, mango y en cítricos las copas de los árboles infectadas son la principal fuente de inóculo a partir de la cual el salpique del agua lluvia acarrea y dispersa las conidias hacia los frutos inmaduros; en mango y cítricos las flores infectadas también contribuyen a elevar los niveles de inóculo, en almendro los frutos momificados en el campo representan la principal fuente de inóculo para las infecciones. En mortiño, el hongo sobrevive como micelio en las ramitas atizonadas, que se constituyen en la principal fuente de inóculo en la primavera; sin embargo, información reciente sugiere que la principal fuente de inóculo puede ser la que proviene de las yemas florales latentes, pues se ha demostrado que aunque aparentemente puedan lucir sanas se encuentran infectadas por *C. acutatum*. A medida que las yemas pierden la dormancia, el hongo crece hacia fuera de éstas y coloniza el tejido alrededor del tallo ocasionando lesiones negras alrededor de las yemas infectadas, las lesiones se extienden dando muerte a las yemas y a cualquier tejido por encima de la lesión. Posteriormente pasados unos 7 días, el hongo esporula en los tejidos muertos. En mortiño ocurren dos picos de dispersión de esporas, el primero, coincide con la floración y los estados tempranos de desarrollo de los frutos, y el segundo pico, ocurre en la maduración del fruto. En los frutos inmaduros el hongo inicia las infecciones quiescentes y los síntomas de la enfermedad se expresan cuando el fruto inicia su maduración (Wharton y Diéguez, 2004).

En Colombia, la Antracnosis de los cítricos causada por *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds., fue atribuida inicialmente a *Colletotrichum gloeosporioides*; pero a partir de 1999, se iniciaron estudios que han permitido conocer que el patógeno es *C. acutatum*; el cual ataca botones y flores, permaneciendo en infecciones quiescentes sobre el follaje, y exhibiendo niveles altos de tolerancia a benomil. Los estudios preliminares de la estructura genética de la población del hongo indican que existe gran variabilidad, y que parte de esa variación puede asociarse con la altitud donde se desarrolla el cultivo y con la especie cítrica (Osorio, 2003).

C. acutatum, es un patógeno de plantas, bien documentado, que no poseía reportes que lo mencionaran como agente etiológico de enfermedades en animales o humanos, hasta el año 2002 cuando se reportó el caso de una tortuga de mar *Lepidochelys kemp* en Kemp's Ridley afectada por el hongo. El animal, posiblemente con compromiso inmune e hipotermia, después de la estación fría desarrollo una infección por el hongo en pulmones y riñones. Este reporte amplía el rango de enfermedades causadas por esta especie (Manire *et al.*, 2002).