CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Colletotrichum* spp. ASOCIADAS A *Coffea arabica* EN COLOMBIA Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL CBD

ANDRÉS FERNANDO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D. C.
Agosto 03, 2007.

NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia."

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Colletotrichum* spp. ASOCIADAS A *Coffea arabica* EN COLOMBIA Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL CBD

ANDRÉS FERNANDO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

APROBADO

_____
ALVARO LEÓN GAITÁN Ph.D.
DIRECTOR

_____
MARIA XIMENA RODRÍGUEZ
JURADO

_____
JOSE SALVADOR MONTAÑA
JURADO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Colletotrichum* spp. ASOCIADAS A *Coffea arabica* EN COLOMBIA Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL CBD

ANDRÉS FERNANDO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

APROBADO

_____	_____
ANGELA UMAÑA MUÑOZ Ph.D.	**DAVID GÓMEZ M.Sc.**
DECANA ACADÉMICA	**DIRECTOR DE CARRERA**

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de encaminarme por el fascinante mundo de la Biología Molecular y por darme sabiduría y empuje para la realización de esta tesis.

A mis padres, Leonor González de Rodríguez y Fernando Rodríguez López, por ser mi principal ejemplo de vida, mis amigos, las personas a las que les debo absolutamente todo lo que tengo y todo lo que soy, por ser ellos quienes constantemente me han apoyado y me dan voz de aliento para salir adelante en cada uno de mis tropiezos.

A mis hermanos, Diana Patricia, Daniel Alberto y Claudia Jimena, por que sin ellos mi vida no sería la misma, por ser mis confidentes, mis consejeros, las personas con las que puedo contar *pa' las que sea*.

A mi novia, Sandra Patricia Valdés Gutiérrez, la mujer que durante toda la ejecución de mi tesis tuvo la valentía de estar siempre al lado mío, de soportar mis días de estrés, por darme su corazón, de ser mi familia cuando estuve lejos de casa y de ser la mujer con la que he pasado los momentos más felices.

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Javeriana, por la formación que me aportó para la ejecución de la tesis.

A la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Al Centro Nacional de Investigaciones de Café “Pedro Uribe Mejía”, CENICAFE.

A la Disciplina de Fitopatología de CENICAFÉ.

Al Dr. Alvaro León Gaitan Bustamante, Ph.D. director del Departamento Biología y Líder de la Disciplina de Fitopatología de CENICAFÉ, por el amplio conocimiento que me aportó, su apoyo y paciencia en la conducción de este trabajo de tesis.

A mis compañeros de la Disciplina de Fitopatología (Sandra Valdés, Carolina Escobar, Leonardo Cárdenas, Narmer Galeano, Mauricio Serna), de la Disciplina de Entomología (Alejandra Sánchez, Sandra Idarraga, Juan Carlos Flores, Lucio Navarro, Javier Mantilla) y de la Disciplina de Mejoramiento Genético (Alejandra Díaz, Fernando García, Gloria La Torre, Duván Gallego)

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN 1

1.2. MARCO TEÓRICO 5

1.2.1 Clasificación taxonómica 5

1.2.1.1. Según Agrios, 2005 5

1.2.1.2. Según NCBI, 2007 6

1.2.2. *Colletotrichum gloeosporioides* 6

1.2.3. *Colletotrichum acutatum* 7

1.2.4. *Colletotrichum kahawae* 7

1.2.5. *Colletotrichum* en el cultivo del café 7

1.2.5.1 Mancha mantecosa 8

1.2.5.2. Antracnosis en hojas 9

1.2.5.3. Antracnosis en tallo y muerte descendente 10

1.2.5.4. Antracnosis en flores 10

1.2.5.5. Antracnosis en frutos 11

1.2.5.6. Enfermedad de las cerezas del café 11

1.2.5.6.1. Origen y dispersión del CBD 12

1.2.5.6.2. Importancia económica 13

1.2.5.7. Infecciones latentes 14

1.2.6. Estrategias de penetración de *Colletotrichum* 15

1.2.6.1. Penetración intracelular hemibiotrófica 15

1.2.6.2. Penetración necrotrófica intramural, subcuticular 16

1.2.7. Métodos e identificación de *Colletotrichum* 17

1.2.7.1. Caracterización molecular 18

1.2.7.1.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 19

1.2.7.1.2. PCR en tiempo real (qRT-PCR) 20

1.2.7.1.3. Espaciadores de Trascripción Interna (ITS) 22

1.2.7.1.4. β- tubulina 22

1.2.7.1.5. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPDs) 23

1.2.7.1.6. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) 24

1.2.7.1.7. Región amplificada caracterizada por una secuencia (SCAR) 26

1.3. JUSTIFICACIÓN 28

1.4. REFERENCIAS 30

CAPÍTULO II

CREACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE REFERENCIA DE *Colletotrichum* spp. ASOCIADO A CAFÉ
2.1 INTRODUCCIÓN 39

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS 40

2.2.1. Ubicación 40

2.2.2. Aislamiento y conservación de *Colletotrichum* spp. a partir de tejido de *Coffea arabica* 40

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42

2.4. REFERENCIAS 46

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN INTERESPECÍFICA DE AISLAMIENTOS

DE *Colletotrichum*
3.1. INTRODUCCIÓN 48

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS 50

3.2.1. Caracterización interespecífica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. 50

3.2.2. Anotación de secuencias 51

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 52

3.3.1. Extracción de ADN genómico de *Colletotrichum* spp. 52

3.3.2. Amplificación, secuenciación y anotación de ITS 53

3.3.3. Amplificación, secuenciación y anotación de β- tubulina 61

3.3.4. Análisis global 62

3.4. REFERENCIAS 70

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN INTRAESPECÍFICA DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp.
4.1. INTRODUCCIÓN 74

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS 76

4.2.1. Caracterización con RAPDs 76

4.2.2. Caracterización con AFLPs 76

4.2.3. Análisis de resultados 77

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 78

4.3.1. Genotipificación de aislamientos de *Colletotrichum* con marcadores RAPDs 78

4.3.2. Genotipificación de aislamientos de *Colletotrichum* con marcadores AFLPs. 81

4.4. REFERENCIAS 88

CAPITULO V

EVALUACIÓN DE MÉTODOS BIQUÍMICOS Y MOLECULARES DE DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE *Colletotrichum* spp. ASOCIADAS A CAFÉ
5.1 INTRODUCCIÓN 89

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS 91

5.2.1. Prueba de hidrólisis de caseína 91

5.2.2. Diseño de SCARs para la detección e identificación de especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a café. 91

5.2.3. Análisis de PCR en Tiempo Real para genotipificación de *Colletotrichum* spp. aislado de café 92

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 93

5.3.1. Prueba de hidrólisis de caseína 93

5.3.2. Diseño de SCARs para la detección e identificación de especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a café. 94

5.3.3. Análisis de PCR en Tiempo Real para genotipificación de *Colletotrichum* spp. aislado de café 94

5.4. REFERENCIAS 96

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES 97

RECOMENDACIONES 100

ANEXOS 101

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 2.1. Variabilidad macroscópica de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. en agar PDA + estreptomicina 42

Figura 2.2. Conidias de *Colletotrichum* spp. encontradas en el análisis microscópico de los aislamientos. Aumento 40X 43

Figura 3.1. Separación electroforética en agarosa de productos de extracción de ADN genómico de *Colletotrichum* spp. 53

Figura 3.2. Separación en agarosa de productos amplificados por PCR para las regiones ITS del ADN ribosomal (~ 600 pb) y el gen de β- tubulina (~ 900 pb) de *Colletotrichum* spp. 56

Figura 3.3. Mapa del rADN señalando los primers usados en la amplificación y el amplicón obtenido. 57

Figura 3.4. Dendrograma de la población en estudio obtenido a partir de la secuenciación de ITS. 60

Figura 3.5. Mapa del gen de la β-tubulina mostrando los primers usados en la amplificación y la longitud del amplicón generado. 63

Figura 3.6. Dendrograma de la población en estudio obtenido de las secuencias de β-tubulina. 65

Figura 3.7. Dendrograma final de caracterización interespecífica de *Colletotrichum* spp. asociado a café obtenido a partir de las regiones del rADN y β-tubulina. 66

Figura 3.8. Comparación de las secuencias de β-tubulina presentes en aislamientos colombianos de café y homólogos en GenBank (gi) 67

Figura 4.1. Curvas de estandarización de concentración de $MgCl_2$ (desde 1.5 mM hasta 3.0 mM) para la amplificación de marcadores RAPDs en *Coletotrichum* spp. 78

Figura 4.2. Patrones de bandeo de RAPDs generados con los primers PALF 215, PALF 251 y PALRN 928. 79

Figura 4.3. Dendrograma consenso obtenido a partir de las tres matrices binarias de los marcadores encontrados en RPDs. 80

Figura 4.4. Patrones de bandeo de AFLPs generados con la combinación de primers E-AC/M-A, E-AC/M-C y E-TA/M-C en *Colletotrichum* spp. 82

Figura 4.5. Dendrograma construído a partir de marcadores AFLPs de aislamientos de *Colletotrichum* spp. colombianos asociados a café 83

Figura 4.6. Patrones de bandeo de AFLPs generados con las combinaciones de primers E-AC/M-A, E-AC/M-C y E-TA/M-C con individuos de *Colletotrichum* spp. colombianos y africanos (CIFC). 84

Figura 4.7. Dendrograma obtenido de marcadores AFLPs de aislamientos colombianos y africanos. 87

Figura 4.8 Análisis de coordenadas principales com árbol de recorrido mínimo 86

Figura 5.1. Prueba de hidrólisis de caseína en medios CHM (Casein Hydrolysis Medium) a las 48 horas de incubación 93

Figura 5.2. Algunos de los marcadores AFLPs aislados del gel de poliacrilamida para sintetizar SCARs. 94

Figura 5.3. Comportamiento de la curva de melting para: *C. acutatum* (A); *C. gloeosporioides* (B); *C. gloeosporioides* con patrón atípico (C); *C. kahawae* (D) y *C. gloeosporioides* con patrón fluorescente raro y *C. kahawae* (E). 95

Figura 5.3. Hipótesis del surgimiento de las tres especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica*. 97

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 3.1. Resultados del análisis de BLATSn de las secuencias de ITS 59

Tabla 3.2. Resultados de BLASTn para la amplificación de β-tubulina 64

Tabla 3.3. Predicción de ubicación y longitud de intrones y exones en secuencias de ITS de *Colletotrichum* spp. 54

Tabla 3.4. Predicción de ubicación y longitud de intrones y exones en secuencias de β- tubulina de *Colletotrichum* spp. 55

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1.1. Enfermedades del cafeto en el mundo 103

Anexo 1.2. Características morfológicas y patogénicas de especies de *Colletotrichum* comúnmente asociadas a café 104

Anexo 3.1. Protocolo de extracción directa de ADN según Goodwin & Lee, 1993. 105

Anexo 3.2. Origen de los aislamientos caracterizados de *Colletotrichum* asociados a café, secuencia homologa con el GenBank y su correspondiente respuesta a hidrólisis de caseína 107

Anexo 5.1. Agar de hidrólisis de caseína 108

RESÚMEN

Con el fin de caracterizar las poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas al cultivo del café en Colombia y determinar si existe variabilidad genética entre y dentro de las especies de *Colletotrichum* spp. aisladas de este cultivo, se obtuvieron a partir de tejido foliar de plantas de café, colectado en los municipios de Chinchiná (Caldas) y La Plata (Huila), 28 aislamientos pertenecientes al género *Colletotrichum* spp. Por medio de la amplificación y secuenciación de rADN (ITS) y β-tubulina, y el posterior análisis de BLASTn, se determinó que las especies encontradas correspondieron a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. La distribución de las subunidades e intrones en estas secuencias fueron anotadas y comparadas para iniciar un análisis de diversidad genética de la población. Al evaluar la prueba de Hidrólisis de Caseina como un método alterno para diferenciar las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* de una manera más rápida y sencilla, se encontró una variabilidad intraespecífica que impide su uso con fines taxonómicos. Posteriormente, por medio de marcadores moleculares obtenidos de amplificaciones al azar (RAPD) se realizó una caracterización inicial de la población, encontrándose tres grupos de *C. gloeosporioides* y dos de *C. acutatum*. Para el uso de marcadores de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) y su posible uso en el diagnóstico de la enfermedad de las cerezas del café (CBD), se anexó al estudio, ADN de *C. gloeosporioides* y *C. kahawae* procedentes de los países africanos de Zimbabwe, Camerún, Kenia y Malawi. El dendograma obtenido confirmó la existencia de dos grupos principales, el grupo de *C. acutatum* y el grupo de *C. gloeosporioides* y *C. kahawae*. Una vez se detectaron los marcadores polimórficos en los AFLP, se diseñaron primers a partir de marcadores amplificados de secuencias caracterizadas (SCAR) con el fin de poder diferenciar mediante qRT-PCR las especies *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. kahawae*, sin embargo sólo se logró la diferenciación de los aislamientos e *C. gloeosporioides* lejanos de *C. kahawae*.

Palabras Claves: *Colletotrichum* spp., marcadores moleculares, SCAR, ITS, β-tubulina, qRT-PCR.

ABSTRACT

With the aim of performing a characterization of a population of *Colletotrichum* spp, associated with Colombian coffee plantations and determining whether there is a genetic variability at a interspecific and intraspecific level among the isolates, it was obtained 28 isolates belonging to the genera *Colletotrichum* form coffee tissue collected from the municipalities of Chinchina (Caldas) and La Plata (Huila). By means of rDNA (ITS) and β-tubulin amplification and sequencing, and a subsequent BLASTn analysis, it was determined that the species found belonged to *C. gloeosporioides* and *C.acutatum*. It was performed gene annotation in order to find the location of the introns and exons in these sequences. By evaluating the test of Casein Hydrolysis as a alternate method to differenciate between *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* in a quick and easy way, it was found a intraspecific variability that impeded the use of these protocol as a taxonomic one. Subsequently, by means of molecular markers obtained from random amplifications (RAPDS), it was done a initial characterization of the population, the constructed dendogram showed three clusters of *C. gloeosporioides* and two of *C. acutatum*. By using molecular markers such as AFLP and in order to find a possible use in the CBD diagnosis, it was attached to this study, some *C. gloeosporioides* and *C. kahawae* DNA samples from the african countries of Zimbabwe, Cameroon, Kenia and Malawi. The dendogram confirmed the existence of two main groups, the one of *C. acutatum* and the other one made of *C. gloeosporioides* and *C., kahawae*. To find a *Colletotrichum* associated to coffee diagnosis method based on qRT-PCR, AFLP polymorphic markers were used to design primers from SCARs, however, only the *C. kahawae* furthest members of *C. gloeosporioides* could be diagnosed.

Key words: ***Colletotrichum*** **spp., Molecular Markers, SCARs, ITS, β-tubulin, qRT-PCR.**

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Aunque el café no es considerado como un cultivo alimenticio, representa una importante fuente de ingresos para la mayoría de los países cultivadores de café, por su exportación (Silva *et al,* 2006). El café es el producto agrícola de más importancia en Colombia por sus extensas 775 000 hectáreas de cultivo, el efecto social como fuente de 672.000 empleos directos en el sector rural y los 11.3 millones de sacos exportados por año (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2005). Sin embargo, las condiciones geográficas y medioambientales favorables que se tienen para su cultivo, con altas precipitaciones y constantes temperaturas y humedades relativas a lo largo del año, también son propicias para la proliferación de microorganismos patógenos principalmente hongos, que son agentes causales de una variedad de enfermedades en el café. En café se han reportado unas 10 enfermedades de origen fúngico (Anexo 1.1), que están relacionadas no solo con la geografía y el clima, sino también con el tipo de caficultura que se practica. De esta manera el sombrío, el manejo de arvenses, la densidad de siembra, las fertilizaciones, y por supuesto las variedades sembradas, juegan papeles importantes en la aparición y desarrollo de epidemias.

A nivel mundial, los factores más limitantes en la producción de café incluyen sus principales enfermedades como son la Roya Anaranjada del Cafeto y la Enfermedad de las Cerezas del Café (CBD) causada por *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome y *Colletotrichum kahawae* Bridge & Waller, respectivamente (Silva *et al,* 2006).

Tres especies del género *Colletotrichum* se han aislado a partir de frutos de café, hojas y flores: *C. kahawae* (la única especie parasítica, originalmente llamada *C. coffeanum*), *C. gloeosporioides* Penz y *C. acutatum* Simmond

(Silva *et al,* 2006). *C. kahawae* fue reportado por primera vez en Kenia (McDonald, 1926) y en tan sólo seis décadas se ha dispersado por las zonas productoras de café en África, ocasionando pérdidas entre un 20 y un 80 % del producto a cosechar. Aunque el CBD está hasta el momento restringido a África, en otros países cultivadores de café se hace necesario tomar medidas para prevenir la entrada de esta enfermedad (Silva *et al,* 2006).

La alta diversidad encontrada en el amplio grupo de especies del género *Colletotrichum* ha sido muy problemática, ya que el diagnóstico fitopatológico requiere identificar con precisión patógenos específicos para el control de enfermedades. Esta confusión taxonómica ha provocado el aumento en el uso de herramientas moleculares para la identificación de diversidad interespecífica e intraespecífica dentro de un grupo complejo de especies (Guerber *et al*,2003).

El ADN es la molécula que contiene el código genético, siendo sus propiedades el reflejo directo de la identidad genotípica y fenotípica de cada organismo, es muy utilizada en la identificación de especies debido a que está menos influenciada por los efectos del ambiente, y además la interpretación de los resultados es objetiva. Un fragmento de ADN que representa variación genética (polimorfismo) debido a diferencias entre individuos en la longitud o secuencia de la doble cadena en un locus en particular se denomina *marcador molecular*. Los marcadores moleculares de ADN son muy estables y por lo tanto útiles en la identificación de especies y poblaciones (Lewin, 2004).

Existen diferentes métodos para detectar polimorfismos entre los que se encuentra la amplificación del ADN al azar (RAPDs), la digestión de ADN con enzimas de restricción (RFLPs) y la amplificación de regiones no conservadas del ADN ya sean ribosomales (ITS) o intergénicas (IGS). Estas técnicas trabajan con ADN extraído directamente del individuo en grandes cantidades, o con fragmentos de ese ADN amplificado mediante la técnica de PCR. Aunque las regiones ITSs representan solo una parte del genoma,

éstas son suficientemente variables para facilitar la separación a nivel de género y son frecuentemente útiles a nivel de especies en los ascomycetes (White *et al*., 1990).

Otro gen que está cobrando importancia en los estudios filogenéticos es el gen de la β-tubulina que codifica para una de las familias conservadas de las Tubulinas, encargadas de la construcción de los microtúbulos, flagelos de las células eucariotas y la formación del huso acromático en la mitosis. Ha sido de gran utilidad en la reconstrucción de relaciones filogenéticas entre todos los hongos (Villa *et al*, 2006). La mayoría de los hongos poseen un gen para la β-tubulina, sin embargo, en el genoma de *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma graminicola*, *Cryptococcus neoformans*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynome* y *Galactomyces geotrichum* se han reportado dos genes para la β-tubulina (Cruz & Edlind, 1997; Burh & Dickmann, 1994; Goldman *et al*., 1993; Gold *et al*, 1991; Pannaccione & Hanau, 1990; May *et al*., 1987).

La secuenciación consiste en determinar la secuencia de nucleótidos del amplímero obtenido por PCR, rutinariamente por el método de Sanger (Sanger *et al*., 1977). De esta forma se pueden detectar diferencias en uno o unos pocos pares de bases (inserciones, deleciones y diferencias puntuales) que afecten incluso a un sólo nucleótido dentro de todo el amplímero.

Otra técnica útil para el análisis del genoma es la denominada AFLPs (Amplified Fragments Length Polymorphisms) que representa una ingeniosa combinación de análisis RFLP y PCR y ha sido utilizada para la identificación de polimorfismos significativos para obtener patrones específicos de ADN (Vos *et al*., 1995). Los polimorfismos obtenidos se visualizan en geles de poliacrilamida de elevada resolución, similares a los utilizados para secuenciación, marcando los iniciadores con radioactividad o con fluorescencia, o visualizando los fragmentos con tinción de nitrato de plata.

En el presente trabajo se realizará una caracterización molecular interespecífica amplificando las secuencias de las regiones ITS y β-tubulina

de aislamientos colombianos, verificando mediante métodos bioinformáticos si estos corresponden a *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides*, además de una caracterización intraespecífica usando como marcadores moleculares los RAPD y AFLP comparando los aislamientos colombianos con los aislamientos de *C. kahawae* y *C.gloeosporioides* provenientes de África como alternativa para diseñar herramientas de fácil diagnóstico en programas de sanidad vegetal frente a una eventual aparición en el continente americano del organismo causante del CBD.

1.2. MARCO TEÓRICO

Colletotrichum y su telemorfo *Glomerella* han estado implicados en enfermedades en plantas (principalmente antracnosis) alrededor del mundo pero especialmente como la causa de los problemas pre-cosecha y post-cosecha en los trópicos. Su habilidad para causar infecciones latentes lo ubica entre los patógenos más importantes de la post-cosecha. (Bailey & Jeger, 1992)

1.2.1 Clasificación Taxonómica

Su distribución es mundial y actualmente el taxón se considera constituido por 39 especies (Sutton, 1992) entre las que se encuentran tanto saprófitas como parásitas. Las especies patogénicas causan serias pérdidas en un amplio número de plantas cultivadas entre las que se cuentan cereales, pastos, frutales, leguminosas, y cultivos perennes en regiones tropicales y subtropicales. Los síntomas de ésta enfermedad son frecuentemente una lesión denominada antracnosis, pudiendo lesionar la mayor parte de la planta. Al menos tres distintas especies de *Colletotrichum* se han asociado comúnmente con las plantas de café: *C. gloeosporioides, C. acutatum* y *C. kahawae* (Waller *et al*., 1993).

1.2.1.1 Según Agrios, 2005.

Dominio: Eukaryota
Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Filamentous Ascomycetes (III)
Deuteromycetes o Hongos Mitospóricos
Género: *Colletotrichum* (Estado Anamorfo)
Glomerella (Estado Teleomorfo)

1.2.1.2 Según NCBI, 2007. (National Center for Biotechnology Information). Caracterización Molecular por ITS.

Dominio: Eukaryota
Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Subclase: Sordariomycetes incertae sedis
Orden: Phyllachorales
Familia: Phyllachoraceae
Subfamilia: Phyllachoraceae mitospóricos
Género: *Glomerella* (anamorfo: *Colletotrichum)*

1.2.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides (Penz. & Sacc.) fué descrito en el año 1884 es una especie de amplia distribución en todo el mundo especialmente en zonas tropicales y subtropicales. Von Arx (1957) citó más de 600 sinónimos con otras especies de *Colletotrichum* Corda y *Gloeosporium* Desm. & Mont., lo cual indica la gran diversidad del género. Aunque algunas de éstas especies han cambiado el nombre genérico, la gran mayoría se han incluido dentro del grupo de *C. gloeosporioides*. Por su parte, no todas las especies del genero *Gloeosporium* se han incluido en *Colletotrichum,* ya que se han determinado como *Marssonina, Cryptosporioides, Piggotia*, etc. (Sutton, 1992)

Esta especie es heterogénea y en cultivo las características varían notablemente. Pocos progresos se han realizado en la sistemática e identificación de los aislamientos pertenecientes a este complejo basados exclusivamente en las características morfológicas. El tamaño y forma de las conidias y las características del apresorio varían considerablemente y son afectadas por el ambiente (Anexo 1.2). Además, las especies de

Colletotrichum producen conidias secundarias las cuales son más pequeñas y varían en su forma, especialmente cuando el cultivo es viejo.

1.2.3 *Colletotrichum acutatum*

C. acutatum Simmonds ex Simmonds (1968) es un hongo de colonias blancas, que llegan a ser grisosas, en la superficie inferior de color rosado a carmín. Carecen de esclerocios. Con apresorios pálidos a café oscuro, en forma ovalada o de clavo, con las márgenes enteras o ligeramente lobuladas de 8.5 – 10 X 4.5 – 6 µm. Masas de conidias de color rosado a naranja de 8.5 – 16.5 X 2.5 – 4 µm. Se diferencia de *C. gloeosporioides* por su tasa de crecimiento lento (Walker *et al*., 1991.)

1.2.4 *Colletotrichum kahawae*

Colletotrichum kahawae es el agente causal de la denominada enfermedad de la cereza del café (Coffee Berry Disease, CBD) en Africa (Mordue, 1967; Jeffries *et al*., 1990). *C. kahawae* es morfológicamente similar a *C. gloeosporioides* pero se ha diferenciado por su capacidad de infectar cerezas de café verde (Waller, 1982) y por sus características bioquímicas (Anexo 1.2) (Waller *et al*., 1993). Nutman y Roberts (1969) reportaron que *C. kahawae* coloniza la parte externa de la corteza madura de las ramas de café, constituyendo la fuente de inoculo primario para flores y frutos; su importancia radica en que una vez coloniza los frutos, sobre éstos se produce abundante inoculo el cuál afecta nuevos frutos. Para Gibbs (1969), el inóculo producido en las ramas es de menor importancia comparado con el de los frutos por la capacidad para producir mayor cantidad de conidias.

1.2.5 *Colletotrichum* en el cultivo de Café

Boisson (1960) distinguió dos grupos de síntomas; antracnosis de hojas, frutos y ramas, caracterizada por lesiones subcirculares o angulares irregulares, grandes y de cloración marrón y en las cuales se pueden visualizar masas de esporas y estructuras de reproducción sexual del hongo,

y la muerte descendente o dieback, caracterizada por la desecación de las ramas. Sin embargo este hongo también puede estar presente como una infección latente, y se le asocia a manchas foliares conocidas como Mancha Mantecosa.

Gracias a su papel como parásito primario y secundario y su presencia ubicua en el tejido de café, *Colletotrichum* es reportado muchas veces junto con otros hongos. Es uno de los 17 hongos que Siddiqi (1964) nombró como microflora de ramas, hojas y frutos de café en Malawi, once de los cuales incluyendo *Colletotrichum* pueden ser patógenos.

1.2.5.1 Mancha mantecosa

Ha sido registrada en Colombia desde mediados del siglo pasado (Castaño, 1951) y afecta ramas, hojas y frutos de café de las variedades Típica, Caturra y Colombia. Su propagación es restringida y ocurre ocasionalmente en algunas plantas y cultivos comerciales. La importancia de esta enfermedad radica en la heredabilidad de la susceptibilidad, la cual debe conocerse para evitar su propagación masiva (Gil *et al*, 2003).

En hojas de plántulas en estado cotiledonal, los síntomas corresponden a un número variable de manchas redondas de 2 a 4 mm de diámetro, deprimidas, color verde pálido, de apariencia aceitosa y más notables por el haz. En el centro de las manchas más viejas es posible observar por el haz y el envés una zona de color café rojizo. Estos síntomas son similares a los ocasionados por la enfermedad en las hojas verdaderas. En las chapolas que crecen bajo plantas afectadas es común encontrar los síntomas de la enfermedad (Gil *et al*, 2003).

En la parte superior del hipocótilo se presentan manchas alargadas, necróticas, húmedas y deprimidas, que avanzan hasta anillarlo completamente y causar volcamiento de la parte superior de la plántula. En plantas adultas afectadas por la enfermedad, en los entrenudos de las ramas primarias, secundarias y terciarias se encuentran áreas necróticas hundidas,

de color café oscuro y bordes definidos. Es posible encontrar secamiento en ramas que progresa de los brotes hacia el tronco. Las yemas florales de las ramas afectadas mueren. Los frutos son afectados en todos sus estados de desarrollo. En sus primeras etapas los frutos se necrosan y caen fácilmente. En frutos verdes se observan lesiones pequeñas, circulares, de color verde amarillento las cuales posteriormente coalescen formando lesiones grandes, oscuras, de forma irregular, hundidas y con superficie corrugada (Gil *et al*, 2003).

El pergamino se necrosa, la laminilla entre las almendras se destruye y el endospermo se torna negro y de consistencia blanda. En frutos maduros o casi maduros se presentan áreas circulares de color amarillo claro que pueden llegar a cubrirlos y producen su caída ocasionando pérdidas en calidad y cantidad de la cosecha (Leguizamón & Baeza, 1973; Leguizamónm *et al*, 1979).

1.2.5.2 Antracnosis en hojas

Las lesiones necróticas de color café se producen generalmente en las márgenes de las hojas y a medida que la enfermedad avanza se desarrollan anillos concéntricos en los cuales los acérvulos se hacen visibles principalmente en el haz de la hoja como pequeños puntos negros. Fue inicialmente muy común en India y Uganda y actualmente se reporta en la mayoría de los países cafeteros. Aunque este hongo puede ser claramente un colonizador inicial de las hojas, también puede estar seguido de enfermedades previas como la Roya del Cafeto causada por el hongo *Hemileia vastatrix* Berk & Br. y *Cercospora coffeicola* (Mancha de Hierro) Berk. & Cooke o en plantas que sufren de deficiencia de nutrientes o ataques de insectos (Gil *et al*, 2003; Firman & Waller, 1977).

1.2.5.3 Antracnosis en tallo y Muerte Descendente

Los síntomas de la Antracnosis en tallos se han descrito desde 1969. En las lesiones ocurridas en las ramas jóvenes comienzan a aparecer manchas amarillas que rápidamente se cambian a café. Generalmente se inicia en los nudos también aunque tiene lugar en los entrenudos. Las lesiones pueden ser de varios centímetros de largo y se delimitan por un halo amarillo. Eventualmente la corteza se rompe longitudinalmente, lugar donde se forman los acérvulos que en condiciones húmedas producen abundantes conidias (Vidal, 1977). En ataques severos las ramas suelen estar con lesiones en toda su extensión. La enfermedad avanza necrosando los tejidos de arriba hacia abajo haciendo que las hojas cambien de color amarillo a negro y eventualmente se secan y caen.

El diagnóstico de la muerte descendente en cultivos con árboles perennes es muchas veces difícil. Probar el papel causal de *Colletotrichum* en la muerte descendente en café es complicado por la existencia de este hongo como saprófito en la corteza del café cerca a tejido ya lesionado. *Colletotrichum* spp. está presente normalmente en corteza de café aparentemente sana aunque en ocasiones pueden colonizar capas más profundas y causar necrosis en la parte interna de la corteza (Van de Graaf *et al*, 2002)

1.2.5.4 Antracnosis en Flores

En 1990 mediante pruebas de patogenicidad se determinó la participación de *Colletotrichum* en el secamiento de flores de café en estado de “comino”, en muestras provenientes de fincas del municipio de Palestina (Caldas) (Gil,1990); posteriormente, a raíz de los cambios climáticos de los últimos años y específicamente en aquellos caracterizados por lluvias abundantes seguidas por temperaturas altas, se registró secamiento o necrosis de flores y frutos de café en fincas de los municipios de Manizales, Marmato, Manzanares y Palestina (Gil,1995). El daño en flores en estado de comino se ubica en los nudos de la parte media e interna de la rama. Se caracteriza por

la presencia de manchas de color café oscuro que se inician en la base de la flor y de allí se extienden hasta cubrirla totalmente. La flor afectada permance adherida al glomérulo hasta su necrosis total; ocasionalmente, el estilo de la flor continúa con su crecimiento abortando la corola afectada. Asociado con este daño, en algunos casos, se presentan manchas necróticas en la parte superior de los nudos afectados. Arcila (1985) describe una daño similar en flores en desarrollo ocasionado por golpe de sol en los nudos del tercio superior de la rama (Gil *et al*,2003).

1.2.5.5 Antracnosis en Frutos

En frutos maduros la infección por *Colletotrichum* generalmente ocurre como manchas hundidas las cuales se expanden rápidamente hasta cubrir la totalidad del fruto. Es la antracnosis más reportada por los países cafeteros. Sin embargo, debido a que esta enfermedad ocurre en los frutos maduros o en estadios cercanos a la madurez no es de suma importancia, quizá llega a hacer el proceso de despulpado más tedioso si la semilla no se ha colonizado. Por el contrario, la antracnosis en frutos inmaduros conocida localmente como la Enfermedad de las Cerezas del Café (sigla en ingles CBD: Coffee Berry Disease) y que hasta el momento se encuentra restringida al continente africano, es la antracnosis de más importancia a nivel mundial en café y la causante de mayor pérdidas económicas debido a que puede causar pérdida directa del cultivo al infectar las flores y frutos jóvenes inmaduros (Firman & Waller, 1977).

1.2.5.6 Enfermedad de las Cerezas del Café (Coffee Berry Disease. CBD)

La enfermedad de las cerezas del café es una antracnosis en frutos de café verdes y maduros y es causada por *C. kahawae*. Este hongo ataca todos los estadios del cultivo desde flores hasta frutos maduros y ocasionalmente ataca también hojas, pero las máximas pérdidas de los cultivos ocurren cuando se efectúa el ataque en cerezas verdes (Firman & Waller, 1977).

Hay dos síntomas distintos en los frutos, las lesiones “activas” y las “costrosas”. Las lesiones activas comienzan con un hundimiento pequeño, irregular y oscuro que se dispersa rápidamente hasta cubrir la totalidad de la superficie del fruto. Bajo condiciones de alta humedad se produce una masa de conidias rosadas en la superficie de las lesiones. Las cerezas también pueden desprenderse apenas se desarrolle la lesión activa. Las lesiones costrosas son normalmente de color marrón pálido, débilmente hundidas y a veces tienen anillos concéntricos de acérvulos negros. Las lesiones costrosas esporulan escasamente, si alguna vez es que llegan a esporular. Aunque estas lesiones se pueden volver activas cuando el fruto madura, no afectan el crecimiento de los frutos y no tienen efecto detectable en el rendimiento. En las variedades que muestran resistencia al CBD, las lesiones costrosas son a menudo el único tipo de lesiones producidas y son un indicador de defensa del huésped. Estas lesiones también son producidas con una mayor frecuencia en las variedades susceptibles cuando las condiciones son desfavorables para el desarrollo de la enfermedad o cuando estas variedades no han recibido aplicaciones de fungicidas durante el desarrollo temprano de los frutos (Bailey & Jeger, 1992).

1.2.5.6.1 Origen y dispersión del CBD

En África donde ocurre el CBD, causada por *C. kahawae*, las pérdidas en productividad llegan aproximadamente del 50 al 80%. (Rodrigues, 2006) La enfermedad de las cerezas del café fue reportada por primera vez en Kenia cerca de los límites con Uganda en 1922. La enfermedad pronto se dispersó a muchos estados del occidente de Rift Valley en Kenia. En los 50s, el CBD ya había cruzado Rift Valley y se estableció en las principales áreas cafeteras del oriente. Se ha sugerido que antes de que el café se cultivara en Kenia, el patógeno se encontraba como un saprofito sobre los progenitores diploides naturales del halotetraploide de *C. arabica* tales como *C. eugenoides*, que crecen en África Central y la aparición del CBD en Kenia fue

el resultado de reencuentro con un patógeno ancestral. Otros reportes de CBD vinieron de Zaire en 1938, Camerún en 1955. El CBD apareció en Tanzania en las laderas del monte Kilimanjaro en 1964. Sin embargo, no fue sino hasta 1971 que la enfermedad se reportó en Etiopia, en el centro de la diversidad genética de *Coffea arabica*. Reportes más recientes se confirmaron en Malawi, Zimbabwe y Zambia en 1985 a través de especimenes recibidos en el Instituto Internacional de Micología (Bailey & Jeger, 1992).

El CBD no se ha reportado fuera de África, aunque varias lesiones menos serias tales como antracnosis en frutos maduros causada por *Colletotrichum* que ocurren en todo el mundo y varios casos de muerte descendente en Guatemala, Costa Rica e India se han asociado a *Colletotrichum*. Los aislamientos obtenidos de estos lugares son tipos de *C. gloeosporioides* y cepas no virulentas de *C. kahawae*. La lenta dispersión del CBD se contrasta con una más rápida como es la de la roya anaranjada del café. Las esporas del CBD se liberan y se dispersan sólo por la lluvia. Sin embargo, también pueden viajar largas distancias en material vegetal enfermo o latentemente infectado y en vectores pasivos como aves, el hombre y la maquinaria. El CBD también puede también ser iniciado al usar frutos afectados como fuentes de semillas. La dispersión de la enfermedad en África se pudo haber logrado por alguno de estos métodos (Bailey & Jeger, 1992).

1.2.5.6.2 Importancia económica

La antracnosis en ramas generalmente conlleva a una Muerte Descendente que puede llegar a ser seria en ciertos cultivos y especialmente bajo condiciones medioambientales adversas excepto el tipo de Muerte descendente severa atribuida específicamente a *C. coffeanum* la cual no es tan común. La pudrición café de las frutas maduras es común donde sea que se cultive café pero es muy molesto en áreas donde este es procesado de forma húmeda (despulpado y secado). En estas áreas se producen brotes

severos de enfermedades durante temporadas húmedas que causan dificultades al momento de despulpado, desmanchado y pérdida de calidad. En su primera aparición en Kenya, el CBD causó en varios casos 75% de pérdidas del cultivo. Desde entonces causó el abandono en el cultivo de café en varios distritos de Kenya y Etiopía y pudo ser uno de los factores que previno el incremento de cultivo de *Coffea arabica* en Angola. Nutman (1966) estimó que en 1964 sólo el CBD causó una pérdida financiera de 9.8 millones de dólares que equivale al valor de 10000 toneladas o a una pérdida de 18.9% del potencial del cultivo y entre 1967-68 una severa epidemia de CBD resultó en pérdidas entre el 25 y 30% (Bailey & Jeger, 1992).

1.2.5.7 Infecciones Latentes

En aislamientos hechos de tejido de café por Rayner (1948), se encontró que prácticamente cada pieza de tejido (hoja sana, fruto verde, tallo, pedúnculo) de 1mm^2 produjeron crecimiento fúngico. Estos hongos consistían en *Colletotrichum* en una variedad de formas y especies de *Phoma* y *Phomopsis*. Rayner sugirió que el hecho que estos hongos estuvieran presentes como infecciones latentes en casi todos los tejidos de café sanos podría explicar la consistencia con la cual fructifican en tejidos necróticos y el porqué las enfermedades fisiológicas han sido muy a menudo atribuidas a estos hongos. Esto se confirmó al existir evidencia que sugirió que la pérdida prematura de hojas, maduración irregular de la corteza y de frutos podría estar asociada con el desarrollo de infecciones latentes. Las infecciones latentes en frutos por *Colletotrichum* son comunes en muchos cultivos. Estas infecciones generalmente se activan cuando los frutos maduran. Una característica de las conidias de *Colletotrichum* es que al germinar, ellas desarrollan apresorios de pared gruesa que pueden sobrevivir para producir infecciones progresivas. La frecuencia con la cual las infecciones de *Colletotrichum* se desarrollan en la superficie de frutos verdes en Kenya, especialmente en el extremo del tallo, sugiere que las infecciones latentes o

los apresorios resistentes dormantes son muy abundantes en frutos jóvenes (Bailey & Jeger, 1992).

1.2.6 Estrategias de penetración de *Colletotrichum*

El proceso físico de colonización de *Colletotrichum* es similar en muchas de sus especies. Después de que la espora se adhiere al tejido del hospedante, esta forma un tubo germinativo que da origen a una estructura de infección llamada apresorio, de la cual emerge una estructura denominada "clavija de penetración", que permite el paso directo a la cutícula, (Diéguez *et al*, 2005; Timmer *et al*, 2005; Zulficar *et* al, 1996; Bailey & Jeger, 1992) aunque tambien hay reportes de penetración indirecta a través de estomas o heridas sin formar apresorios, como el caso de *C. acutatum* en cítricos, el cual penetra los pétalos de flores sin la formación de apresorio (Zulficar *et* al, 1996; Bailey & Jeger, 1992). Después de la penetración del hongo, ocurren diferentes estrategias de colonización de los tejidos:

1.2.6.1 Penetración intracelular hemibiotrófica

Se establece una infección inicial a través de una breve fase biotrófica, asociada con una gran hifa primaria intracelular, convirtiéndose después en una fase necrotrófica destructiva asociada con una hifa secundaria angosta, la cual se ramifica a través del tejido del hospedante. En especies que adoptan esta estrategia la fase biotrófica inicial puede variar en cuanto a duración desde menos de 24 horas hasta 3 días. La fase inicial biotrófica es seguida por una fase necrotrófica, la cual comienza con la aparición de hifas secundarias mas angostas. Esta hifa se ramifica a través del tejido del hospedante inter e intracelularmente, muriendo rápidamente las células del hospedante debido a la degradación de la pared celular por parte de las enzimas producidas por el hongo (Diéguez *et al*, 2005; Timmer *et al*, 2005; Wharton & Diéguez, 2004; Zulficar *et* al, 1996).

1.2.6.2 Penetración necrotrófica intramural, subcuticular

Una vez penetrada la cutícula, el patógeno no entra inmediatamente dentro del lúmen celular, sino que se desarrolla debajo de la cutícula, entre la pared periclinal y anticlinal de las células epidermales. No es claro si las células del hospedante permanecen vivas, pero los síntomas solo aparecen hasta 24 horas después de la penetración. Después del breve período asintomático, el hongo comienza a expandirse rápidamente a través del tejido del hospedante intra e intercelularmente, matando las células vegetales y degradando las paredes celulares. El patógeno es favorecido por la lluvia, alta humedad ambiental y temperatura óptima para su desarrollo de 20ºC, con un menor desarrollo a 27ºC y un escaso desarrollo a los 5ºC, 10ºC y 30ºC. La humedad en forma de salpicaduras de lluvia y agua corriente ayuda a la distribución y diseminación de conidias de *Colletotrichum,* sobre la misma planta o de una planta a otra (Diéguez *et al*, 2005; Timmer *et al*, 2005; Wharton & Diéguez, 2004; Zulficar *et* al, 1996; Agostini *et* al, 1992).

En el caso de muchos frutales, pueden ocurrir otras estrategias de infección. Con *C. acutatum,* las interacciones pueden ser intracelular hemibiotrófica cuando infecta frutos maduros de cultivares susceptibles o necrotrófica intramural subcuticular cuando infecta frutos de cultivares resistentes. (Timmer *et al*, 2005; Wharton & Diéguez, 2004)

En hojas de almendras ocurre una combinación de estas dos estrategias, resultando en una colonización intra e intercelular. En este caso, la colonización es biotrófica y una vez el hongo ha penetrado empieza la fase necrotrófica durante el crecimiento intercelular, seguido por una colonización inter e intracelular y la muerte del tejido. (Diéguez *et al*, 2005)

El mecanismo del cambio de la fase biotrófica a necrotrófica es incierto. *Colletotrichum acutatum*, al igual que otras especies de *Colletotrichum*, producen amonio, causando incremento de pH durante el cambio a la fase necrotrófica. En muchas interacciones hospedante-patógeno, la interacción específica a nivel celular es desconocida y puede ser una combinación de las

estrategias mencionadas anteriormente en almendra (Diéguez *et al*, 2005; Wharton & Diéguez, 2004). Estas estrategias pueden depender de los tejidos del hospedante, en algunos casos, por ejemplo, en almendra y muchos cítricos, los tejidos de pétalos de flores son infectados y colonizados sin la formación de apresorio y no existe la fase biotrófica. (Diéguez *et al*, 2005; Wharton & Diéguez, 2004; Föster & Adaskaveg, 1999; Zulficar *et* al, 1996; Maerz & Paul, 1930).

Según Lenne y Parbery (1976), durante un estudio comparativo de germinación y modelos de infección en especies de *Colletotrichum*, se encontró que el apresorio aislado sobre la superficie de hojas se produjo en ausencia de tubos germinativos y conidias, pruebas preliminares sugirieron que no solo los apresorios fueron mas durables que las esporas y los tubos germinativos sino que su formación fue fomentada por la presencia de bacterias.

1.2.7 Métodos de identificación de *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* contiene una colección de hongos extremadamente diversa que incluye hongos tanto saprófitos como fitopatógenos. Estos últimos inicialmente se nombraron de acuerdo a la planta huésped de la cual se aisló. Así fue como se describieron varios taxones, pero el esquema no es satisfactorio ya que esta forma no revela verdaderas relaciones entre las especies de hongos. (Bailey & Jeger, 1992)

Los métodos tradicionales para la discriminación entre especies de *Colletotrichum* se han basado principalmente en la morfología, analizando características tales como tamaño y forma de las conidias, color de la colonia, presencia o ausencia de setas y la existencia del telemorfo *G.cingulata*. Sin embargo, debido a las influencias medioambientales en la estabilidad de las características morfológicas y la existencia de formas intermedias, estos criterios no son siempre los adecuados para la diferenciación confiable de las especies de *Colletotrichum*. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), al usar primer que se anidan a secuencias

específicas, es una técnica molecular rápida y confiable para diferencias entre especies del complejo de *Colletotrichum*. (Freeman & Katan, 1997)
La aplicación de los marcadores moleculares en la taxonomía de los hongos promete aclarar las relaciones entre los distintos taxones que se encuentran poco separados a causa de los estudios morfológicos. Esto es de especial importancia debido a que con esto se puede entender la identidad y complejidad genética de una población de patógenos que afectan un huésped en particular y asimismo es esencial para formular estrategias efectivas de manejo de enfermedades (Bailey & Jeger, 1992).

1.2.7.1 Caracterización molecular

El uso de técnicas moleculares ha posibilitado la distinción entre especies de este género, datos derivados de análisis de ácidos nucleicos proporcionan el arma más confiable para construir la clasificación de *Colletotrichum*.
En estudios de *Colletotrichum*, el trabajo se ha concentrado en dos partes del genoma, mitocondrial (ADNm) y ribosomal (ADNr). Ambos están presentes como múltiples copias dentro de la célula, las cuales permiten el análisis con condiciones experimentales menos severas. Además de estos genes, en los últimos años se ha incrementado el uso de secuencias de genes como la β-tubulina y el Factor de Elongación 1 alpha (EF-1α) (Freeman & Katan, 1997).

Se han usado primers arbitrarios (decámeros) para detectar la diversidad genética en *C.acutatum*, *C.gloeosporioides* y *C.fragariae* (Brigde et al, 1998). En esos análisis los fragmentos generados sugirieron que *C.acutatum* podría estar ubicado en siete grupos, con menores variaciones dentro de un grupo. Las cepas de Europa tuvieron patrones idénticos de RAPD y fueron distintos de las cepas Americanas las cuales estuvieron muy relacionadas entre ellas pero no idénticas. Las cepas de *C. gloeosporioides* de fresa no mostraron variación y fueron idénticos a un grupo de *C.fragariae*. Con análisis de RFLP se observaron altos niveles de variación entre las cepas de *C.*

gloeosporioides de plantas tropicales, con la excepción de cepas obtenidas de mango donde fueron encontrados pocos polimorfismos (Prusky *et al*, 2000).

La identificación de especies por métodos tradicionales (morfología, color de colonia, tamaño de la conidia, etc), pueden no ser suficientes para la identificación de especies y subespecies, lo cual es crítico para el manejo de la enfermedad, mejoramiento y control del patógeno. La compatibilidad vegetativa y técnicas moleculares ofrecen medidas complementarias para la caracterización de la taxa; dichas técnicas han sido utilizadas exitosamente para la identificación y determinación de la diversidad genética de poblaciones de *Colletotrichum*. En recientes estudios, se han utilizado primers específicos de especies para diferenciar entre aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* de cítricos; además los aislamientos de *C. acutatum* provenientes de un amplio rango de hospederos fueron confiablemente agrupados y delineados del aislamiento de *C. gloeosporioides* usando primers específicos de *C. acutatum*. Similarmente usando primers específicos de *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*, los aislamientos de estas dos especies se distinguieron de los de *C. acutatum* (Prusky *et al*, 2000).

1.2.7.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction. PCR)

La PCR es una reacción enzimática en cadena que conlleva a la amplificación de secuencias de ADN específico de un ADN molde determinado. Además del ADN molde, se necesitan dos oligonucleótidos o primers de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, cuya secuencia debe ser complementaria al ADN molde. La amplificación se realiza en presencia de dNTPs como sustrato y la reacción es catalizada por la *Taq* polimerasa. La secuencia entre las dos regiones complementarias a los primers es sintetizada al repetir los ciclos, los cuales consisten en una serie

de temperaturas, donde el ADN es denaturado, los primers se alinean, y se lleva a cabo la polimerización de la secuencia específica o amplicón (Rodrigues, 2006). La nueva secuencia sintetizada ya es ahora disponible como ADN molde para el siguiente ciclo. Es así que teóricamente, por cada ciclo ocurrido, la concentración del ADN amplificado se duplica y pasados 30 ciclos, el rendimiento de la amplificación de una secuencia específica es de $1x10^9$ copias. La PCR alcanza estos resultados debido al hecho de que la reacción en cadena requiere el alineamiento específico de los dos primers a la secuencia complementaria. Un alineamiento inespecífico de los primers al ADN molde no causará el crecimiento exponencial de la secuenia específica sino mas bien una amplificación lineal (Rodrigues, 2006; Burrell, 1993; Bailey & Jeger, 1992).

Una PCR tiene tres fases: exponencial, lineal y plateau. La fase exponencial es la que ocurre primero en la PCR, en la cual el producto incrementa exponencialmente desde que los reactivos no sean limitantes. La fase lineal se caracteriza por un incremento lineal en el producto a medida que los reactivos de la PCR se vuelven limitantes. La PCR eventualmente alcanzará la fase de plateau durante los últimos ciclos y la cantidad de producto no cambiará debido a que varios reactivos se han agotado (Yuan *et al*, 2006).

1.2.7.1.2 PCR en tiempo real (qRT-PCR)

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para medir, en cualquier momento, la

fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación (Costa, 2004).

La PCR en tiempo real es uno de los métodos cuantitativos más confiables y sensibles para análisis de expresión génica. Esta técnica ha sido ampliamente aplicada para la verificación de microarreglos, genotipificación, cuantificación de cáncer, determinación de número de copias de genes heterólogos, y estudio de terapias de drogas. La PCR en tiempo real explota el hecho de que la cantidad de productos de la PCR en la fase exponencial está en proporción a la cantidad del ADN molde inicial bajo condiciones ideales. Durante la fase exponencial, los productos de PCR idealmente se duplicarán durante casa ciclo si la eficiencia es perfecta, i.e. 100% (Yuan *et al*, 2006).

Tanto ADN genómico como cDNA pueden ser usados como moldes para PCR en tiempo real. Los sistemas de detección por fluorescencia empleado en la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes (SYBR Green I) y sondas de hibridación específica, diseñadas y marcadas con fluorocromos aceptor y donador (*molecular beacons*, sondas Taqman, sondas FRET). La base de la PCR en tiempo real es una asociación directa positiva entre el colorante y el número de amplicones (Yuan *et al*, 2006; Costa, 2004).

El SYBR Green I es el colorante más usado para los estudios de PCR en tiempo real por su bajo costo. Gracias a que la fluorescencia de este aumenta en gran forma al unirse a ADN de doble cadena (dsDNA), es un colorante ideal para la detección de productos de amplificación. La máxima absorbancia del SYBR Green I es ~497 nm y la emisión máxima es ~520 nm. El SYBR Green I ofrece varias ventajas para la detección de ácidos nucleicos en tiempo real. Al unirse a todos los dsDNA, no tiene que ser ajustado para ácidos nucleicos moldes de una sola cadena, permitiendo así, que los protocolos se puedan adaptar rápidamente y a un relativo bajo costo. Por otra parte, debido a que el SYBR Green I se une a todos los dsDNA, se

pueden producir señales de fluorescencia de falsos positivos procedentes de dímeros de primers o estructuras secundarias que interfieran con una cuantificación exacta. Este problema puede ser reducido al medir la fluorescencia en la curva de Melting en altas temperaturas. La curva de Melting también puede ser usada para analizar la homogeneidad del producto luego de la corrida (Bio-Rad, 2005).

1.2.7.1.3 Espaciadores de Transcripción Interna (Internally Transcribed Spacers. ITS)

El ribosoma de los eucariotas posee dos subunidades de ADN Ribosomal (rDNA) con diferentes gradientes de sedimentación: 40S y 60S, el cual está codificado por tres genes, la subunidad grande (28S), la subunidad pequeña (18S) y el gen 5.8S, separados por las regiones de los espaciadores de transcripción interna (ITS). La región de los ITS por el hecho de ser intrones es un área de alta variabilidad al no tener una función biológica aparente y por esto acumula mutaciones neutrales a lo largo del tiempo, lo que permite diferenciar individuos relacionados genéticamente (Atkins & Clark, 2004; Cruz, 2003).

La región ITS es quizá ahora el fragmento de ADN más secuenciado en hongos. Ha sido muy útil para estudios de sistemática molecular al nivel de especie y aún dentro de especies (e.g., para identificar razas geográficas) (Duke University, [en línea]).

1.2.7.1.4 β-Tubulina

La tubulina es una proteína globular que se constituye como uno de los mayores componentes de microtúbulos de las células eucariotas. Los microtúbulos están involucrados en todos los movimientos a nivel del citoplasma de todas estas células, jugando una labor fundamental durante la mitosis, ya que son los encargados de la división y desplazamiento del material celular y determinan además el crecimiento celular. Para los análisis

moleculares se utiliza esta proteína por su carácter altamente conservado y común a todos los eucariotas, y porque al conocerse los aminoácidos que la componen en diferentes especies eucariotas, es posible establecer comparaciones entre organismos diferentes e incluso entre miembros de una misma especie, ya que se hace posible distinguir organismos que poseen alelos para β-tubulina diferentes, mediante evaluación de intrones del gen que codifica para esta proteína (Cruz, 2003).

El gen de la β-tubulina se expresa generalmente en niveles altos durante el crecimiento celular y su secuencia nucleotídica ha sido usada muy frecuentemente en análisis filogenéticos para distinguir entre diferentes especies y/o diferentes subgrupos dentro de una especie. Los polimorfismos en el intrón 3 han sido los más explotados para realizar estudios filogenéticos (Amrani & Corio-Costet, 2006). O'Donnel *et al*. (1998) reportó que hay 3.5 veces mas información filogenética en los genes de la β-tubulina que en los genes del rDNA y lo propuso como un marcador útil para estudiar relaciones cercanas en *Fusarium*.

1.2.7.1.5 Amplificación al azar de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorfic DNA. RAPD)

En esta técnica la PCR se usa con un sólo primer corto de generalmente 10 bases de largo, y en su mayoría de veces tiene una alta proporción de Guanina y Citosina. Una de las características de esta técnica es que para aumentar la unión del primer al ADN blanco, la fase de anillaje en el ciclo de PCR se debe llevar a cabo a una baja temperatura, generalmente inferior a 40°C. La reacción de amplificación resulta en fragmentos cortos de ADN, a menudo entre 0.2 y 2 kb de longitud, los cuales pueden ser separados y visualizados en geles de agarosa. Últimamente los RAPDs han adquirido una reputación de carencia de reproducibilidad debido a la baja y no específica temperatura de anillaje, haciendo muy difícil comparar los aislamientos cuando sus amplificaciones se corren en distintos geles y en distintos

momentos, aspecto que no sucede con los AFLPs que no solo da un gran número de bandas sino que al menos un 10% de estas son polimórficas, además que también son patrones de bandeo altamente reproducibles (Bridge *et al*, 1998).

1.2.7.1.6 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (Amplified Fragments Length Polymorfism. AFLP)

La técnica de los AFLP fue descrita por Vos *et al*. (1995). Esta técnica se basa en la amplificación por vía PCR, de un subconjunto de fragmentos generados a partir de la digestión del ADN genómico con una combinación de enzimas de restricción tipo II que clivan el ADN en sitios específicos de corte raro (*Eco*RI) y de corte frecuente (*Mse*I). Es fundamental que la digestión del ADN sea completa, ya que una digestión parcial puede revelar falsos polimorfismos. Para obtener una digestión total es necesario usar ADN de alta pureza. Por lo tanto es preciso prestar atención al método de extracción y de cuantificación usado (Cruz, 2003; Lopes *et al*, 2003).

La técnica se basa en la propiedad de ciertas enzimas de restricción de dejar extremos cohesivos con secuencias conocidas luego de que estas se cliven en el ADN. Así es posible construir secuencias de nucleótidos de doble cadena que se liguen a las extremidades de los fragmentos de restricción, denominadas adaptadores. Una vez que la secuencia de los adaptadores está en los extremos del ADN digerido, se pueden construir cebadores específicos a esas secuencias para realizar una pre-amplificación de los fragmentos de restricción. Los primers se construyen de la secuencia complementaria de los adaptadores seguida de la secuencia del sitio de restricción (Lopes *et al*, 2003).

Teniendo en cuenta que se usan enzimas de corte frecuente y raro al mismo tiempo y como resultado de esta digestión se generan tres clases de

fragmentos: fragmentos de corte frecuente/frecuente, fragmentos de corte raro/raro y fragmentos de corte raro/frecuente. Aunque la combinación de enzimas de restricción más usada en los AFLP es *Eco*RI y *Mse*I, Janssen *et al* (1996) señala que esta combinación es más adecuada para genomas pobres en G+C, *Hind*III/*Mse*I para genomas con contenido de G+C aproximadamente entre un 40 a 50% y *Apa*I/ *Taq*I para genomas ricos en G+C (Lopes *et al*, 2003).

Esta técnica utiliza una amplificación al azar, que en contraste con otras tecnologías de su misma naturaleza, utiliza condiciones de PCR más severas y examina todo el ADN del organismo en evaluación. Además tiene como ventaja que arroja resultados reproducibles y confiables (Cruz, 2003).

En la primera etapa de amplificación, denominada pre-selectiva, no se usan primers con nucleótidos selectivos en el extremo 3' de cada primer generándose así varios millones de fragmentos amplificados que antes de visualizarlos en un gel, es necesario reducir en varios órdenes de magnitud su complejidad. En la segunda fase denominada amplificación selectiva, se usan 1,2 o 3 nucleótidos selectivos adicionados al primer en su extremo 3'. De esa manera, serán amplificados los fragmentos que posean nucleótidos complementarios a los nucleótidos selectivos, reduciendo así 256 veces la complejidad de la colección de fragmentos y haciendo más fácil su visualización por electroforesis en geles de poliacrilamida (Cruz, 2003; Lopes *et al*, 2003).

La técnica de AFLP detecta un mayor número de locus, comparado con las demás técnicas que revelan marcadores moleculares, posibilita amplia cobertura del genoma y es una buena fuente de información para análisis filogenéticos. El uso de enzimas de restricción combinada con las condiciones adecuadas de hibridización de los primers durante las reacciones de amplificación, agrega la robustez de la técnica de RFLP con la practicidad de la PCR. Los marcadores de AFLPs reúnen la capacidad exploratoria de los polimorfismos de los AFLPs (presencia o ausencia de

sitios de restricción) con la ventaja de la PCR. Debido a estas características, poco a poco, los marcadores RAPD están siendo sustituidos por los AFLPs (Lopes *et al*, 2003).

Los patrones de bandeo obtenidos con RAPDs o AFLPs pueden ser usados para determinar la relación entre aislamientos al ser analizados con un gran rango de paquetes bioinformáticos que comparan los patrones y producen dendrogramas indicando los grados de relación entre una población. Los análisis de Bootstrap estiman la confiabilidad de los grupos de los dendrogramas, asegurando la robustez de los resultados (Bridge *et al*, 1998). Las bandas polimórficas generadas por estas técnicas pueden ser secuenciadas para proporcionar SCARs para la detección, diagnóstico o como marcas de ADN alélico (Bridge *et al*, 1998).

1.2.7.1.7 Región amplificada caracterizada por una secuencia (Sequence Characterized Amplified Region. SCAR)

Es una técnica desarrollada por Paran & Michelmore (1993), inicialmente con el fin de mejorar la confiabilidad de los RAPDs y convertirlos en marcadores codominantes. Los SCARs se basan en la secuenciación de un fragmento polimórfico y el posterior diseño de un juego de primers que se unan específicamente a este fragmento. Una de las mayores ventajas de los SCARs sobre los RAPDs y los AFLPs es que estos primeros detectan generalmente un solo locus y por esto son más específicos. La amplificación por PCR de los SCARs son menos sensibles a las condiciones de la reacción, tienden a ser marcadores codominantes y son reproducibles. Los SCARs no requieren grandes cantidades de ADN purificado, en contraste a los métodos de hibridización como en la técnica de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). Con marcadores SCARs, el análisis de los resultados es más sencillo que otros marcadores basados en la PCR como RAPD y AFLP. Estos marcadores se pueden revelar con un solo procedimiento de PCR, sin la necesidad de una subsecuente digestión con enzimas de restricción. La información genómica puede ser obtenida

directamente al analizar los productos de PCR (Kethidi *et al*, 2003 ;Paran & Michelmore,1993)

1.3. JUSTIFICACIÓN

El beneficio de cerezas en buen estado es una condición para la obtención de granos de buena calidad, lo cual es prioritario para que el productor pueda vender su café a buen precio, y es además un reflejo de unas condiciones fitosanitarias adecuadas en un cultivo, lo que conlleva a minimizar pérdidas en la producción. Es precisamente en la postcosecha donde se observa el efecto negativo de las especies del género *Colletotrichum*, patógenos que atacan una gran variedad de frutos tropicales y subtropicales (Coates, *et al*., 1993). Cuando afectan frutos, las estructuras reproductivas germinan sobre la superficie, penetran las capas externas y, una vez adentro, ocasionan la maceración y muerte de los tejidos adyacentes. Por lo tanto, las pérdidas causadas por las especies de *Colletotrichum* ocurren como resultado de una reducción en la calidad y/o cantidad de producto a cosechar. En café, enfermedades como la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) y la antracnosis (*Colletotrichum spp*.) afectan directamente al fruto, generando la aparición de pasillas que alteran la calidad final de este.

Aunque en Colombia las pérdidas ocasionadas por las especies de *Colletotrichum* no se han cuantificado, en los países donde está presente *C. kahawae* éstas han sido estimadas entre el 19 y el 80% de la cosecha, y su control químico puede ocupar hasta un 45% del costo total de producción (Gil *et al*, 2003).

Debido a la gran variabilidad de las características morfológicas, la relativa inestabilidad en las pruebas bioquímicas, la lentitud y relativa dificultad que implican las pruebas de patogenicidad, en la actualidad se utilizan técnicas moleculares para el estudio del genoma de un individuo o una población. Las pruebas moleculares son útiles actualmente para la identificación de especies, y sistemática en muchos organismos.

La caracterización genética de las especies del género *Colletotrichum* que están asociadas a los cultivos de café servirá como complemento a los trabajos que se adelantan en la Disciplina de Mejoramiento Genético en la

búsqueda de resistencia incompleta en variedades o híbridos, y en las pruebas de selección de materiales evaluados en Portugal y Zimbabwe.

La disciplina de Fitopatología, por su parte, precisa de métodos para el diagnóstico correcto de problemas atribuidos a *Colletotrichum*, en particular las antracnosis, y en especial de detección en cuarentena de un patógeno como *C. kahawae*, que aún no se encuentra en las zonas cafeteras de Colombia. Así mismo, al identificar aislamientos altamente patogénicos se pueden desarrollar alternativas de manejo del problema, en particular realizando pruebas para el control químico, cultural o biológico, lo cual contribuirá a minimizar costos de producción y mejorar la calidad de los granos.

Con el fin de caracterizar las poblaciones de *Colletotrichum* asociadas al cultivo del café en Colombia, este trabajo tuvo como objetivos específicos:

- Generar una colección de referencia de *Colletotrichum* en la colección de Microorganismos de CENICAFÉ para comparar en eventuales brotes nuevos de la enfermedad o en la aparición de CBD en el continente americano.
- Determinar la variabilidad genética de las especies de *Colletotrichum* asociadas al cultivo de café en la region central cafetera de Colombia, para adelantar estudios de epidemiología y control de la enfermedad.
- Proveer un método de diagnóstico confiable y rápido para la identificación de las especies de *Colletotrichum* asociadas al cultivo de café

1.4 REFERENCIAS

Agostini J. P., Timmer L. W., Michell D. J. 1992 Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. Phytopathology. Vol. 82. No 11. p. 1377-1382.

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology, 5th edition. Academic Press. New York, USA. 922 p.

Amrani, L. & Corio-Costet M.F. 2006. A single nucleotide polymorphism in the β- tubulin gene distinguishing two genotypes of *Erysiphe necator* expressing different symptoms on grapevine. Plant Pathology 55, 505-512.

Atkins, S. & Clark, I. 2004. Fungal Molecular Diagnostics: A mini review. Journal of applied genetics. 45(1), pp 3-15.

Bailey, J.A. & Jeger M.J. 1992. *Colletotrichum*. Biology, Pathology and Control. Redwood Press. London. England. 388 p.

Bio-Rad Laboratories Incorporated .2005. Chromo 4 System for Real Time PCR. Operation Manual. Catalog Number CFB-3240. 154 p.

Bridge, P.D., Couteaudier, Y., Clarkson, J.M. 1998. Molecular variability of fungal pathogens. CABI international. Wallingford. United Kingdom. 319 p.

Brown, G. E. 1975. Factors affecting post-harvest development of Colletotrichum gloeosporioides in citrus fruits. Phytopathology 65: 404 - 409.

Buhr, T.L. and Dickman, M.B. 1994. Isolation, characterisation and expression of a second β-tubulin–encodind gene fron *Colletotrichum*

gloeosporioides f.sp *aeschynoneme*. Applied and environmental Mycrobiology 60:4155- 4159.

Burrell, M. 1993. Enzymes of Molecular Biology. Humana Press Inc. Totowa. New Jersey. United States of America. 372 p.

Castaño, J.J. 1951. Resultados de la investigación sobre una enfermedad del café en el departamento de Nariño. Boletín informativo Cenicafé 2(21):35-39.

Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. 22(5): 299-305.

Cruz, L.P. 2003. Uso de la diversidad genética de *Beauveria bassiana* para el diseño de alternativas de control de la Broca del café. Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá. Colombia. 71 p.

Cruz, M.C. and Edlind, T. 1997. β-tubulin genes and the basic for benzimidazole sensitivity of the opportunistic fungus *Cryptococcus neoformans.* Microbiology 143: 2003-2008

Diéguez U.J., Föster H., Soto E. A., Adaskaveg J. E. 2005. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. Phytopathology. Ecology and Epidemiology. Vol.95. N0 7. p.751-758.

Duke University. Vilgalys Lab. [en línea]. Conserved primers sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm. [Consulta: 04 Julio, 2007].

Firman, I.D., Waller, M.J. 1977. Coffee Berry Disease and Other *Colletotrichum* Diseases of Coffee. Phytopathological Papers, No. 20. Issue March, 1977. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.

Föster H. & Adaskaveg J. E. 1999. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond antracnose in California. Phytopathology. Epidemiology. Vol. 89. No 11. p. 1056-1065.

Freeman, S., and Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. Phytopathology 87:516-521.

Gibbs J. N. 1969. Inoculum sources for Coffee Berry diseases. Annals of applied biology. Vol. 64 p. 515-522.

Gil, V., L.F. 1990. Pruebas de patogenicidad con *Colletotrichum* sp. aislado de flores de café en estado de comino. En: Centro Nacional de Investigaciones de Café-Cenicafé. Chinchiná. Informe Anual Disciplina de Fitopatología 1989-1990.

Gil, V., L.F. 1995. Daño en flores y frutos de café ocasionados por *Colletotrichum* sp. En: Centro Nacional de Investigaciones de Café-Cenicafé. Chinchiná. Informe Anual Disciplina de Fitopatología 1994-1995.

Gil, V., L.F.; Castro C., B.L.; Cadena G., G. 2003. El Estudio de las Enfermedades del Cafeto en Colombia. Chinchiná (Colombia), Cenicafé. 224 p.

Gold, S.E., Casale, W.L.and KeenN.T. 1991. Characterisation of two β-tubulin genes from *Geotrichum candidum*. Molecular and General Genetics 230: 104-112

Goldman G.H. , Temmerman W., Jacobs, D., Contreras, R., van Montagu, M and Herrera-Estrella, A. 1993. A nucleotide substitution in one of the β-tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimitotic drug methyl benzimidazole 2 –yl-carbamate. Molecular and General Genetics 240: 73-80.

Guerber J.C., Liu B., Correll J.C. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia,* 95(5). pp. 872–895.

Jeffries, P., Dodd, J.C., Jeger,M. J., Plumbley, R.A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crop. Plant Pathology 39: 343 –366.

Kethidi, D., Roden, D., Ladd, T., Krell, P., Retnakaran, A.. and Feng, Q. 2003. Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the asian Long-Horned Beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). Archives of Insect Biochemistry and Physiology 52: 193-204.

Lapeyre, B., Chillet, M., Dubois, C., Mourichon, X. 2000. Importance of different sources of inoculum and dispersal methods of conidia of *Colletotrichum musae*, the causal agent of banana anthracnose, for fruit contamination. Plant Pathology 49: 782 - 790

Leguizamón C., J.E. & Baeza A., C.A. 1973. La “Mancha Mantecosa” una nueva enfermedad del cafeto en Colombia. Avances Técnicos Cenicafé No.27: 1-4.

Leguizamón C., J.E., Cadena G., G., Baeza A., C.A., Sierra S., C. 1979. Mancha Mantecosa en Caturra. Avances Técnicos Cenicafé. No. 94. 1-4.

Lenne J. M., Parbery D. G. 1976. Phyllosphere antagonists and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. Notes and brief articles. Trans. BR. Mycol. Soc. Vol.66.p. 334.

Lewin, B. 2004. Genes VIII. Eighth Edition. Pearson Prentice Hall. New York. United States of America. 1027 p.

Lopes, R., Lopes, M.T., Vargas, A., Aramba, L. E., Pelegrinelli, M.H., Sampaio, M., Carneiro, M.L. 2003. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). Aspectos técnicos e interpretação genética. Biotecnologia Ciência & Desemvolvimento No. 29. 56-60.

Maerz, A. y Paul, M. 1930. A dictionary of color. New York: McGraw Hill. p.207.

May, G.S. Tsang, M.L.S., Smith, H. Fidel, S. and Morris, N.R. 1987. *Aspergillus nidulans* β-tubulin gene are unusually divergent. Gene 55: 231 – 243.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2005. Memorias 2002- 2006. Manejo Social del Campo. [en línea]. Colombia. http://www.minagricultura.gov.co/18_descargas/documentos/_despacho%20ministro/MEMORIAS%202005.doc. [Consulta 08-Ago-06].

Mordue,J.M. (1967). *Colletotrichum coccodes*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. Nº 131. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

National Center for Biotechnology Information. (NCBI). [en línea]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/. [Consulta: 20 Junio, 07]

O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg H. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia. Vol. 90. No. 3. 465-493.

Param, I. & Michelmore R. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in letucce. Theoretical and Applied Genetics. 85: 985-993.

Panaccione, D.G. & Hanau R.M. 1990 Characterisation of two divergent β-tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. Gene 86: 163 – 170.

Prusky D., Freeman S., Dickman M. B. 2000. *Colletotrichum* Host specificity, pathology, and host – pathogen interaction. APS Press. St. Paul, Minnesota. 135-137.

Rodrigues, S. 2006. Estudos histopatológicos da mancha manteigosa en cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. en plantas obtidas por cultura de embriao. Tesis de Maestría en Agronomía con énfasis en Fitopatología. Universidade Federal de Lavras. Lavras. Brasil. 104 p.

Sanger, F., Nicklen, S., and Conlson, A.R. 1977 DNA sequencing with chain - terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science USA 74: 5463 – 5467

Silva, M., Várzea V., Guimarâes L.G., Azinheira H.G., Fernandez D., Petitot A.S., Bertrand B., Lashermes P., Nicole M. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. Brazilian Journal of Plant Physiology 18(1):119-147.

Stanghellini, M.E. & Agaraki, M. 1966. Relation of periderm formation and calose deposition to anthracnose resistence in papaya fruit. Phytopathology 55: 440 - 450

Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. *In* Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds) *Colletotrichum* – Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford, pp. 1-26.

Swinburne, T.R. 1983. Quiescent infections in post harvest disease. In Dennis, C. (ed).Post harvest Pathology of fuits and vegetables. Academic Press, London, pp 1-21.

Timmer L. W., Adaskaveg J. E., Correl J. C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. Plant disease. Vol. 89. No 8. p. 784-796.

Van de Graaf, P., Joseph, M. E., Chartier-Hollis, M. J., O´Neill T. M. 2002. Prepenetración stages in infection of clematis by *Phoma clematidina*. Plant Pathology. Vol 51. p. 331-337.

Vidal, C., G.M. 1977. Estudio sobre el agente causal de la Muerte Descendente en el cafeto *Coffea arabica L.* y comportamiento en cuatro

cariedades comerciales. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia - ICA. Bogotá. Colombia.

Villa N.O., Kageyama K., Asano T., Suga H.2006. Phylogenetic relationships of Pythium and Phytophthora species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and b-tubulin gene sequences. Mycologia, 98(3), 2006, pp. 410–422.

Von Arx, J., (1957). Die Arten der Der Gattung *Colletotrichum* Corda. Phytopath. Z., 29: 413-468.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau M. 1995. AFLP: A New techinique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research. Vol 23, No 21, 4407-4414.

Walker, J., Nikandrow, A. and Millar, G.D. 1991 Species of *Colletotrichum* on Xanthium (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in the genus *Colletotrichum*. Mycological Research 95, 1175 –1193.

Waller, J. M.; Bridge, P.D.; Black, B.; Hakiza, G. 1993. Characterization of the coffe berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. Mycological Research 97 (8): 989-994.

Wharton, S. P. & Diéguez, U. J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del jardín botánico de Madrid. Vol. 61. p. 3-22.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR

portocols: A guide to methods and ampliffications. (Ed. Innis, M.A., Gelfanda, D.H., Sninsky, J., White, J.T.) Academic Press. New York.

Yuan, J.S., Reed, A., Chen F. and Stewart C.N. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. BCM Bioinformatics 7:85.

Zulficar M., Brlansky R. H., Timmer L. W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides*. Mycologia. vol.88. p. 121-128.

CAPITULO II

CREACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE REFERENCIA DE *Colletotrichum* spp. ASOCIADO A CAFÉ

2.1. INTRODUCCIÓN

El estudio de poblaciones implica la limitación de trabajar con una muestra del total de individuos. Esa muestra debe en lo posible ser representativa de la población bajo estudio, y dependiendo de su diversidad fenotípica y genotípica, de su distribución en el espacio y en el tiempo, servirá para inferir parámetros que afecten a toda la población. Por la diversidad de los genotipos del género *Coffea* presentes en la Colección Colombiana de Café, y por poseer unas condiciones ideales para su cultivo, se considero que La Granja, ubicada en los predios de Cenicafé, en Chinchiná, Caldas, era un sitio de muestreo importante para estudiar las poblaciones de Colletotrichum asociadas a este cultivo. Como contraste, se tomo la región de La Plata, Huila, con unas condiciones de caficultura contrastantes con La Granja, caracterizadas por cultivos de *Coffea arabica* var. Caturra y var. Colombia, altitudes por encima de los 1600 m, y por lo tanto condiciones de nubosidad y humedad que son marginales para el cultivo de la planta.

Una de las formas clásicas de reconocer y caracterizar un hongo fitopatógeno es el aislamiento de este a partir de cortes de tejido vegetal sano y enfermo. El hongo puede ser aislado y crecido en un medio artificial y luego ser identificado basándose en las esporas producidas en el medio. Las estructuras fúngicas más importantes para realizar la identificación son las esporas, sus estructuras formadoras y las características del cuerpo fructífero

(micelio). Al usarse estas características, se puede sugerir la clase, el orden, la familia, y el género al cual pertenece un hongo en particular (Agrios, 2005)

Con el fin de obtener una muestra inicial de *Colletotrichum* spp. asociado a café en Colombia, y con este material realizar análisis de caracterización molecular de los aislamientos colombianos junto con los procedentes de África causantes de CBD, se llevó a cabo la creación de una colección de referencia de *Colletotrichum* spp. a partir de tejidos de café.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Ubicación

Las recolecciones de tejidos para realizar los aislamientos de *Colletotrichum* se llevaron a cabo principalmente en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones de Café "Pedro Uribe Mejía" (CENICAFÉ) en el municipio de Chinchiná, Caldas y en la subestación Naranjal (Chinchiná, Caldas) (Latitud: 4° 58'N; Longitud: 75° 39'W) y La Plata (Huila) (Latitud: 2° 23'N; Longitud: 75° 56'W).

2.2.2 Aislamiento y conservación de *Colletotrichum* spp. a partir de tejido de *Coffea arabica*.

Con el fin de crear una colección de referencia de *Colletotrichum* spp. asociado a Café, se realizó una recolección de material vegetal enfermo de *Coffea arabica*, que incluyó tejidos de hoja, flor y fruto con síntomas de antracnosis. El material obtenido en campo, fue llevado al laboratorio para su procesamiento.

El procesamiento y siembra de los tejidos se realizó siguendo el protocolo de Agrios, 2005. Los cortes se realizaron con un escalpelo estéril, teniendo en cuenta que en cada corte se involucrara tanto tejido necrótico como tejido sano. Una vez obtenidos los cortes de los tejidos, se hizo un lavado durante

30 s en una solución de Hipoclorito de Sodio 4.5% (v/v), tiempo en el cual se realizaron tres lavados con abundante agua destilada estéril.

Para las siembras de los tejidos sobre Agar, se colocaron cinco cortes de tejido por cada placa de Agar PDA (Agar Papa-Dextrosa) adicionado de Estreptomicina (0.2 g/L), teniendo en cuenta el tipo de tejido cortado. Las placas se incubaron a 26℃ durante cuatro días, tiempo en el cual se procedió a una identificación microscópica realizando improntas con tinción Azul de Lactofenol. Los hongos que presentaron características similares a las del género *Colletotrichum* (Anexo 1.2) se aislaron y por medio de constantes identificaciones macro y microscópicas se evidenció la purificación paulatina de los hongos.

Los hongos aislados se conservaron en tubos con Agar Sabouraud en pico de flauta y se incubaron a 26℃. Cuando la superficie del agar estuvo cubierta por el micelio del hongo, se adicionó una solución estéril de Glicerol 20% (v/v), hasta cubrir la totalidad del micelio. Los hongos fueron conservados a temperatura ambiente en la Coleccion de microorganismos de Cenicafe.

Se construyó una tabla para anexar a la base de datos de la colección de referencia de microorganismos de CENICAFÉ, teniendo en cuenta el tejido del cual se obtuvo cada aislamiento y el lugar de procedencia del tejido del cual se recuperó el aislamiento.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez se purificaron los hongos, se obtuvo una población en estudio que constó de 21 aislamientos presuntivos de *Colletotrichum* spp. basándose solamente en una caracterización macro y microscópica (Anexo 1.2).

En el análisis macroscópico de las colonias de los distintos aislamientos de *Colletotrichum* spp., se observó una diversidad en micelios algodonosos desde abundantes a pobres y en cuanto a color se presentó una variación desde blancos a grises e inlcuso, en el caso del aislamiento ColH01, se presentó un micelio de color gris-café (Figura 2.1). Basándose en las características que se usaron para la clasificación de los hongos (Anexo 1.2), se puede concluir que hubo una alta variabilidad tanto macroscópica como microscópica en la totalidad de la población en estudio y teniendo en cuenta que se tienen organismos con características macroscópicas similares a las de *C. kahawae* (e.g. color de colonia), se prueba que el uso de estas características no son las adecuadas para realizar una caracterización a nivel de especie.

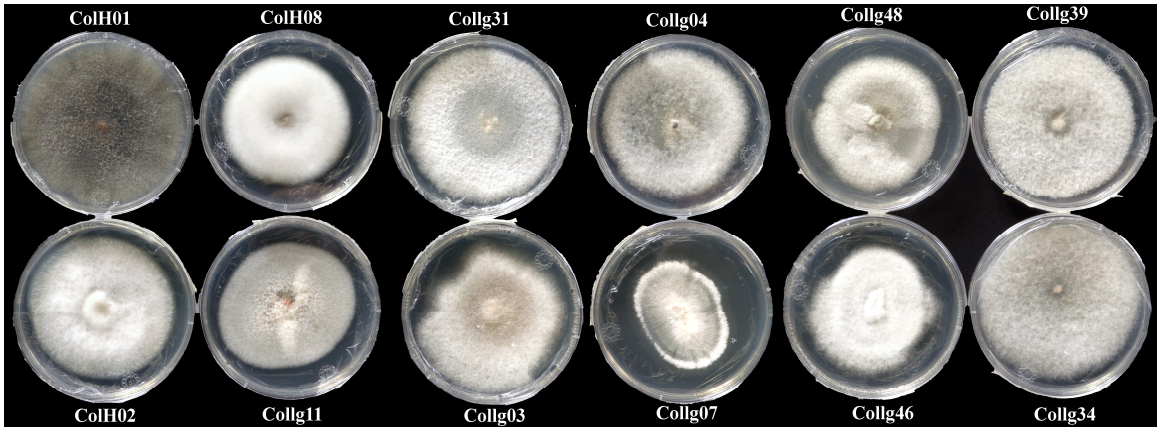


Figura 2.1 Variabilidad macroscópica de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. en agar PDA + Estreptomicina.

El análisis microscópico efectuado a cada uno de los aislamientos se basó principlamente en la forma de las conidias, encontrándose conidas nucleadas largas, cilindricas con extremos puntiagudos o curvos. Como se observa en la Figura 2.2, la alta variación en el tamaño de las conidias incluso en un mismo aislamiento dificultó el uso de este parámetro para presumir de alguna forma la especie a la que pertence cada uno de los ailamientos.

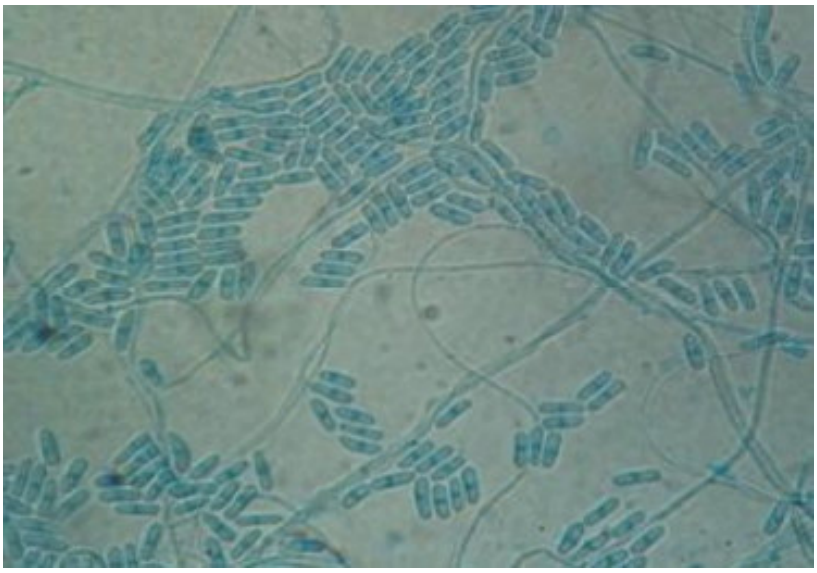


Figura 2.2 Conidias de *Colletotrichum* spp. encontradas en el análisis microscópico de los aislamientos. Aumento 40X.

Uno de los apectos importantes a tener cuenta al momento de aislar un hongo fitopatógeno es la metodología usada para realizar los cortes del tejido ya que al realizar cortes de sólo tejido necrótico se puede hacer más dificil la recuperación del agente causal de una enfermedad debido a la alta presencia de organismos contaminantes saprófitos que compiten por alimento y espacio con el hongo de interés, recuperándose así otros organismos que no esten involucrados con la enfermedad. Por el contrario, si se realizan cortes de tejido solamente sano, la posibilidad de recuperar el hongo es muy baja. Es por esto que se siguió la metodología señalada por

Agrios, 2005, en la cual cada corte contiene tanto tejido sano como enfermo, y se facilitó la recuperación de *Colletotrichum* spp. debido a que la infección en el tejido se encontraba aún en progreso.

La metodología de los cortes unida a la eliminación de organismos contaminantes como bacterias, levaduras y otros hongos mediante los lavados con una solución de Hipoclorito de Sodio 4.5% permitió una recuperación aún más selectiva del hongo de interés ya que al realizarse la desinfección de la superficie del tejido, permitió que las estructuras que colonizaron el tejido durante el proceso infeccioso, permanecieran intactas.

Durante la incubación de los tejidos en Agar PDA + Estreptomicina (0.2 g/L), se observó gran crecimiento de distintos hongos y levaduras. Entre los hongos que se pudieron observar al realizar la caracterización microscópica inicial, haciendo parte de la flora acompañante de *Colletotrichum* spp., se encontraron, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Trichoderma* spp, *Nectria* spp. El hecho de haber recuperado otros organismos contaminantes pudo deberse posiblemente al corto tiempo de desinfección de la superficie del tejido que causó una desinfección parcial de esta dejando algunos organismos en estado de latencia.

De los diferentes cortes realizados en tejidos de flor, hoja y fruto de *Coffea arabica*, se logró recuperar hongos presuntivos de *Colletotrichum* spp. en tejidos de hojas y fruto, mientras que en flor, al presentarse gran cantidad de flora acompañante, fue muy difícil realizar aislamientos de este hongo, posiblemente por la existencia de hongos con una tasa de crecimiento más alta que este. *Colletotrichum* spp. ha sido aislado a partir de flores en estado de “comino” como agente causal del secamiento floral en varios municipios de Caldas (Gil *et al*, 2003).

Una vez que los aislamientos fueron clasificados dentro del género *Colletotrichum* spp por sus características macro y microscópicas, se hizo una conservación de los hongos usando el método de siembra en agar en pico de flauta y adicionando Glicerol.

El mantenimiento y la preservación cultivos de hongos son elementos escenciales para estudios sitemáticos y de biodiversidad. Teniendo en cuenta que los hongos son un grupo muy diverso, se requieren varios métodos de cultivo y preservación para asegurar la viabilidad, morfología, fisiología e integridad genética de los cultivos a través del tiempo. Sin embargo, el costo y la conveniencia de cada método debe tomarse en consideración (Mueller *et al*, 2004). Ya que los hongos mitospóricos constituyen un grupo económicamente importante de hongos fitopatógenos, su conservación *ex-situ* por un largo periodo de tiempo ha ganado mucha importancia para la comunidad científica (Borba & Rodrigues, 2000).

El método escogido para la conservación de los hongos ha demostrado una buena preservación de hongos mitospóricos en periodos de hasta dos años, aunque la esporulación sea afectada cuando se propague en varios medios, como es el caso de cepas de *Phomopsis* que solo fueron capaces de esporular luego de la adición de brotes de hojas de alfalfa en agar agua (Borba & Rodrigues, 2000).

Se creó una colección de *Colletotrichum* spp, aislado de diferentes tejidos que presentaban antracnosis, que a su vez exhibieron una alta variabilidad morfológica, que corresponde a una muestra representativa de las variaciones de las poblaciones asociadas a café (Anexo 3.2).

2.4 REFERENCIAS

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology, 5th edition. Academic Press. New York, USA. 922 p.

Borba, C. de M. & Rodrigues K.F. 2000. Viability and sporulating capability of Coelomycetes preserved under a range of different storage regimes. Revista Iberoamericana de Micología, 17: 142-145.

Freeman, S., Shaby, E., Katan, T. 2000. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of Anemone (*Anemone coronaria* L.). Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66. No. 12. P 5267- 5272.

Gil, V., L.F.; Castro C., B.L.; Cadena G., G. 2003. El Estudio de las Enfermedades del Cafeto en Colombia. Chinchiná (Colombia), Cenicafé. 224 p.

Guerber J.C., Liu B., Correll J.C. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia,* 95(5). pp. 872–895.

Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S.2004. Diversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press. Burlington, MA. USA.

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

Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. *In* Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds) *Colletotrichum* – Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford, pp. 1-26.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN INTERESPECÍFICA DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp.

1.1 INTRODUCCIÓN

En el caso del género *Colletotrichum* spp. los métodos tradicionales de discriminación entre especies, se basan primeramente en la morfología y preferencia de hospedero. El uso de características morfológicas es complicado debido a la inherente plasticidad fenotípica de este género y a la inestabilidad de las características morfológicas. Estas técnicas no siempre son confiables y se ha tenido la necesidad de usar otras técnicas con el fin de ganar más infromación de este patógeno (Swart, 1999). La confusión entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* también está compuesta por un amplio rango de hospederos y la ocurrencia de más de una especie en un huésped específico (Freeman, 2000), además de su amplia diversidad morfológica y genética (Guerber *et al*, 2003).

La PCR es probablemente el invento metodológico más importante en la biología molecular hasta la fecha. Desde su aparición a mediados de los 80's, se ha convertido rápidamente en un procedimiento rutinario en cada laboratorio de biología molecular para identificar y manipular material genético (Chen & Janes, 2002). Por esto esta técnica es la herramienta más usada para realizar análisis de poblaciones y poder diferenciar los organismos por su especie a través de una caracterización interespecífica.

Los avances en la fitopatología molecular han proporcionado un nuevo conjunto de herramientas diagnosticas y técnicas usadas para la detección e identificación de patógenos aún cuando estos se encuentran presentes en un número muy bajo o en una mezcla con otros organismos estrechamente

relacionados. Tales herramientas incluyen análisis de fragmentos de los ácidos nucleicos, cálculo del porcentaje de hibridación de los ácidos nucleicos y la determinación de la secuencia de nucleótidos del ADN de un patógeno (Agrios, 2005).

Los ITS son uno de los fragmentos más amplificados en la actualidad para establecer relaciones filogenéticas entre eucariotas. Esto es porque esta sección típicamente muestra variación a nivel de especies, y su característica de multicopia y sitios altamente conservados lo hace fácil de amplificar en todos los hongos, aún cuando el material es limitante en cuanto a cantidad o calidad. La actual y creciente disponibilidad de secuencias de ITS que puedan ser usadas para futuros estudios ha aumentado su valor y su uso (Bruns & Shefferson, 2004)

Aunque el rADN ha sido ampliamente usado en estudios filogenéticos, la evolución de un gen puede no representar la evolución de un genoma entero. Por esto es necesario usar tantos genes independientes como sea posible y comparar las filogenias derivadas de estos genes para ver si se soportan o se contradicen entre si. Estos genes codifican para metabolitos y proteinas estructurales tales como la citocromo oxidasa II y la β-tubulina respectivamente. Estos genes son conservados y el alineamiento de sus secuencias es menos ambiguo comparado con el rADN (Villa *et al*, 2006).

La amplificación y secuenciación de los ITS y B-tubulina, además de los estudios bioinfomáticos relacionados, tuvo como finalidad caracterizar los aislamientos colombianos y africanos de forma interespecífica, determinando de una manera confiable la especie de cada uno de los aislamientos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Caracterización interespecífica de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Para cada uno de los aislamientos de *Colletotrichum spp.* de la colección de Microorganismos de CENICAFÉ, se realizó una extracción de ADN, siguiendo el protocolo de Goodwin & Lee, 1993 (Anexo 3.1). Una vez eluído el ADN en Buffer EB, se corrió un gel de Agarosa 1% teñido con 1 µl de Bromuro de Etidio a un voltaje de 70V durante 50 min para evaluar la calidad del ADN extraído.

Con el fin de confirmar el género y determinar la especie de cada aislamiento, además de las muestras de ADN enviadas desde el CIFC (Portugal) de *C. kahawae* Z1, Q2, Ca1 procedentes de África, se realizó una amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 con los primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') (White *et al.* 1990) e ITS4 (5'-TCC CTT TCA ACA ATT TCA CG-3') (Neuvéglise *et al.* 1994) (Figura 3.3). Por otra parte, la región β-Tubulina se amplificó con los primers Bt-T2m-Up (5'-CAA CTG GGC TAA GGG TCA TT-3') y Bt-LEV-Lo1 (5'-GTG AAT TCC ATC TCG TCC ATA-3') reportados por Jong *et al*. 2000 (Figura 3.4). Las condiciones de la PCR usadas para amplificar los tres marcadores fueron: 2 µM de cada primer, 1X de buffer PCR, 2mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 1.25 U de *Taq* Polimerasa y 30ng de DNA molde con una denaturación inicial de 95°C durante 5min, una denaturación de 94°C por 1min 30seg, un alineamiento de 55°C durante 1min, una extensión de 72°C por 2min, 40 ciclos y una extensión final de 72°C durante 5min.

La amplificación de las regiones se evidenció en geles de Agarosa 1.5% teñido con 1 µl bromuro de Etidio. El producto de PCR se purificó de acuerdo al protocolo del QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN® y se ajustó a una concentración de 50ng/µl con un volumen de 15 µl. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar en Macrogen (Corea del Sur).

La calidad de los cromatogramas resultantes se evaluaron con el programa PHRED (Ewing *et al*., 1998) en la sección de Bioinformática de CENICAFÉ, y las secuencias cuyas bases presentaron valores superiores a 20 se consideraron para ensamblaje con el paquete CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Los contigs obtenidos se compararon contra la base de datos GenBank usando BLASTn (Altschul, *et al*, 1997) en el NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Las secuencias que presentaron similitudes con valores esperados (*E-values*) inferiores a 10^{-20} se utilizaron para el análisis filogenético usando los programas ClustalW (Thompson *et al*., 1994) y PAUP 4.0 (Sinnauer Associated). El soporte de los dendrogramas obtenidos se realizó mediante la prueba de Bootstrapping, con 100 repeticiones en los dos programas.

1.2.2 Anotación de Secuencias.

Para predecir los intrones y exones de cada una de las secuencias de ITS y β-tubulina, se usaron secuencias de genes previamente anotadas y colocadas en el GenBank.

Para la anotación de los ITS y β-tubulina se usaron las secuencias con códigos gi|134808306|dbj|AB299412.1| (*Aspergillus lentulus* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete cds, strain: ATCC MYA-3) para la anotación de los ITS y gi|167301|gb|M34492.1|COGTUB1B (*C.graminicola* beta-tubulin-2 (TUB2) gene, complete cds) para la anotación de β-tubulina.

Usando las secuencias del GenBank como molde para la anotación, se realizó un alineamiento de las secuencias usando el programa ClustalW y basándose en la anotación de estas, se identificaron por genómica comparativa, los espacios que correspondieron en cada secuencia a los intrones y exones. La anotación de las secuencias se llevó a cabo en el Área de Bioinformática de CENICAFÉ.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Extracción de ADN genómico de *Colletotrichum* spp.

Con el objetivo de comenzar los análisis moleculares en los hongos aislados a partir de café, se extrajo ADN a partir de micelio. El protocolo de Goodwin & Lee, 1993 ADN se realizó estrictamente como se indica en el anexo 3.1, exceptuando que el ADN de todos los individuos fue eluido en un volumen de 100 ul de Buffer EB. Las concentraciones de ADN obtenidas en la extracción fluctuaron entre 30 y 200 ng/ul, cantidad suficiente para la realización de la PCR, ya que esta técnica permite la amplificación del ADN molde a partir de cantidades tan bajas como 0.1 ng (Lee Taylor, 1990).

Como se observa en la figura 3.1, el ADN extraído es de buena calidad ya que al evidenciarse una sola banda indica que este no se encuentra degradado. Además, el proceso de degradación del ARN se llevó a cabo de forma correcta ya que en ninguna de las muestras se presentó un barrido en la parte baja del gel que indique la presencia de este. El marcador usado (λ DNA/*Hind* III) en la electroforesis de las muestras de la extracción de ADN, está catalogado como uno de los marcadores de peso molecular convencionales más usado para medir ADN genómico (Promega, 2006). Las bandas del ADN extraído de los hongos migraron de acuerdo con la primera banda del marcador de peso molecular o la de mayor peso molecular como se observa en la figura.

La anotación de genes tiene como finalidad hacer mas útiles las secuencias de un genoma al correlacionarlas con otros conocimientos como identificación de genes, operones, sitios regulatorios, elementos genéticos móviles y secuencias repetitivas en el genoma, asignar o sugerir funciones donde sea posible y relacionar secuencias con otros organismos, especialmente aquellos que tienen disponibles las secuencia completa del genoma (Blattner *et al*, 1997) . Con las secuencias de los ITS y β-tubulina de la población en estudio de *Colletotrichum*, se realizó una aproximación de

genómica comparativa con secuencias previamente anotadas de organismos cercanos a *Colletotrichum*, y de conocimiento público (GenBank).

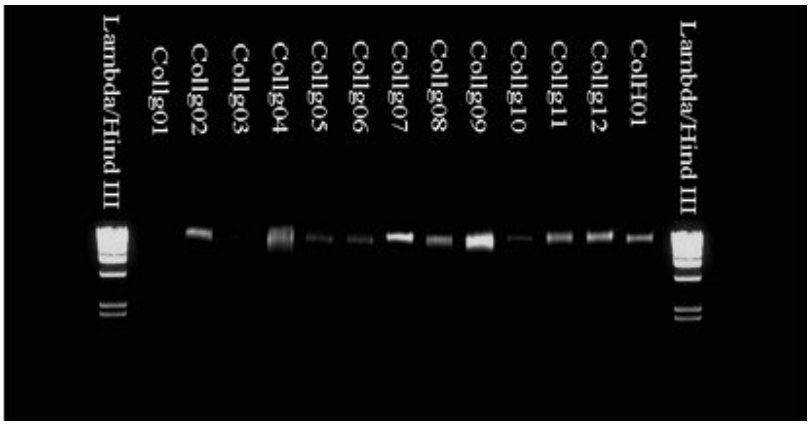


Figura 3.1 Separación electroforética en agarosa de productos de extracción de ADN genómico de *Colletotrichum spp.*

3.3.2 Amplificación, Secuenciación y Anotación de ITS

Al realizar la amplificación mediante PCR de los fragmentos ITS1 e ITS2 de la población en estudio y los ADN provenientes de África, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 600 pb, basándose en la ubicación del amplicón en la electroforesis al usarse como marcador de peso molecular ΦX174 DNA/*Hae* III, tal como se observa en la Figura 5. La amplificación realizada con los primers ITS1 e ITS4 permiten la obtención de un producto de PCR que involucra a la fracción ITS1-5.8S-ITS2 de rDNA (Figuras 3.2 y 3.3).

Al anotar las secuencias de ITS se logró hacer una diferenciación de los intrones y exones haciendo una predicción de la longitud en pares de bases (pb) de las subunidades del rADN 5.8S y 28S y las secuencias no codificables ITS1 e ITS2 (Tabla 3.3), encontrándose en las primeras, longitudes medias de 156 bp y 46 bp respectivamente y en cuanto a los intrones, 191 bp para los ITS 1 y 149 bp para los ITS 2.

Tabla 3.3 Predicción de ubicación y longitud de intrones y exones en secuencias de ITS de *Colletotrichum spp.*

Individuo	18S	ITS1	5.8S	ITS2	28S
ColH01	<1	1-196	197-343	344-508	509->554
ColH02	<1	1-184	185-341	342-496	497->543
ColH03	<1	1-182	183-339	340-495	496->542
ColH04	<1	1-181	182-338	339-495	496->542
ColH05	<1	1-181	182-338	339-491	492->538
ColH06	<1	1-174	175-331	332-486	487->533
ColH07	<1	1-181	182-338	339-489	490->536
ColH08	<1	1-178	179-335	336-486	487->533
Collg03	<1	1-170	171-327	328-467	468->514
Collg04	<1	1-170	171-327	328-482	483->529
Collg05V	<1	1- 222	223-369	370-535	536->581
Collg07	<1	1-174	175-331	332-487	486->532
Collg10	<1	1-186	187-343	344-483	484->544
Collg11	<1	1-182	183-339	340-485	486->531
Collg14	<1	1-170	171-327	328-478	479->525
Collg19	<1	1-172	173-329	330-480	481->525
Collg24	<1	1-172	173-329	330-481	482->528
Collg26	<1	1- 185	185-342	343-482	483->543
Collg31	<1	1-173	174-330	331-459	460->506
Collg34	<1	1-168	169-325	326-475	476->522
Collg38	<1	1-172	173-329	330-479	480->524
Collg39	<1	1-169	170-326	327-472	473->515
Collg45	<1	1-179	180-365	366-505	506-564
Collg46	<1	1-173	174-330	331-480	481->526
Collg48	<1	1-175	176-332	331-482	483->526
Collg 50	<1	1-187	188-345	346-485	486->545
Z1	<1	1-179	180-326	327-491	492->543
Q2	<1	1-186	187-333	334-498	499->549

Para confirmar que los hongos previamente caracterizados por estudios macro y microscópicos pertenecían al género *Colletotrichum* spp, y luego de revisar la calidad de la secuenciación con los electroferogramas, las especies con mayor similitud en los resultados de BLASTn para los ocho aislamientos de la Plata (Huila) fueron *C. acutatum*; 12 de los 13 hongos aislados en Chinchiná (Caldas), fueron catalogados como *C. gloeosporioides*. El aislamiento denominado Collg11 fue el único organismo que aislado de tejido procedente de Chinchiná (Caldas), fue denominado por los resultados de BLASTn como *C. acutatum* (Tabla 3.1) Igualmente, el análisis de BLASTn

confirmó la especie de los ADN de los organismos Z1, Q2 y Ca1, previamente reconocidos en el CIFC como *C. kahawae* (Anexo, 3.2).

Tabla3.4 Predicción de ubicación y longitud de intrones y exones en secuencias de β-tubulina de *Colletotrichum spp.*

Individuo	Exón	Intrón	Exón
ColH01	<1 - 625	626 - 678	679 - >850
ColH02	<1 - 626	627 - 686	687 - >822
ColH03	<1 - 636	637 - 696	697 - >855
ColH04	<1 - 641	642 - 702	703 - >811
ColH05	<1 - 628	629 - 688	689 - >852
ColH06	<1 - 627	628 - 687	688 - >854
ColH07	<1 - 632	633 - 694	695 - >822
ColH08	<1 - 626	627 - 686	687 - >838
Collg03	<1 - 622	623 - 675	676 - >853
Collg04	<1 - 626	627 - 679	680 - >844
Collg05V	<1 - 617	618 - 672	673 - >814
Collg07	<1 - 630	631 - 682	683 - >845
Collg10	<1 - 627	628 - 681	682 - >829
Collg11	<1 - 628	629 - 688	689 - >849
Collg14	<1 - 622	623 - 677	678 - >834
Collg19	<1 - 627	628 - 680	681 - >853
Collg24	<1 - 628	629 - 681	682 - >852
Collg31	<1 - 593	594 - 646	647 - >808
Collg38	<1 - 614	615 - 660	661 - >795
Collg39	<1 - 595	596 - 653	654 - >788
Collg45	<1 - 625	626 - 678	679 - >844
Collg46	<1 - 623	624 - 676	677 - >848
Collg48	<1 - 586	587 - 639	640 - >805
Z1	<1 - 620	621 - 673	674 - >839
Q2	<1 - 596	597 - 649	650 - >814

Con las secuencias de ITS de la población, se construyó un dendrograma (Figura 3.4), en el cual se logró un agrupamiento diferencial conformado por el grupo de *C. acutatum* y un segundo grupo de *C. gloeosporioides*, el cual contenia a los individuos de *C. kahawae* Z1 y Q2 (valor de Bootstrap de 9669), indicando que frente a toda la población en estudio, los individuos Z1 y Q2 en la mayoría de casos, se van a agrupar juntos, sugiriendo que deben existir algunas mínimas diferencias entre las especies *C. gloeosporioides* y *C. kahawae* que deben ser las aprovechadas y utilizadas para el diagnóstico

de cada una de estas especies, principalmente del segundo por ser de tanta importancia económica en café.

La distribución de los aislamientos de *C. acutatum* en el dendrograma se caracterizó por la formación de tres grupos cada uno de estos apoyados por altos valores de Bootstraping, encontrándose el aislamiento ColH01 como el más lejano de esta especie. Con respecto al agrupamiento de los miembros de *C. gloeosporioides* se presentó gran variabilidad estableciéndose tres grupos de los cuales en uno se presentó una tricotomía, posiblemente por falta de información con respecto al gen de los ITS para estos organismos (i.e. Collg24, Collg19 y Collg31)

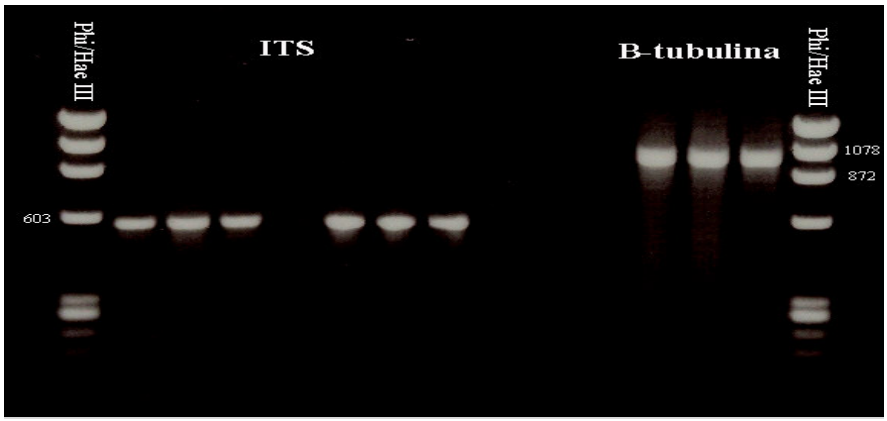


Figura 3.2 Separación en agarosa de productos amplificados por PCR para las regiones ITS del ADN ribosomal (~600pb) y el gen de β-tubulina (~900pb) de *Colletotrichum spp*.

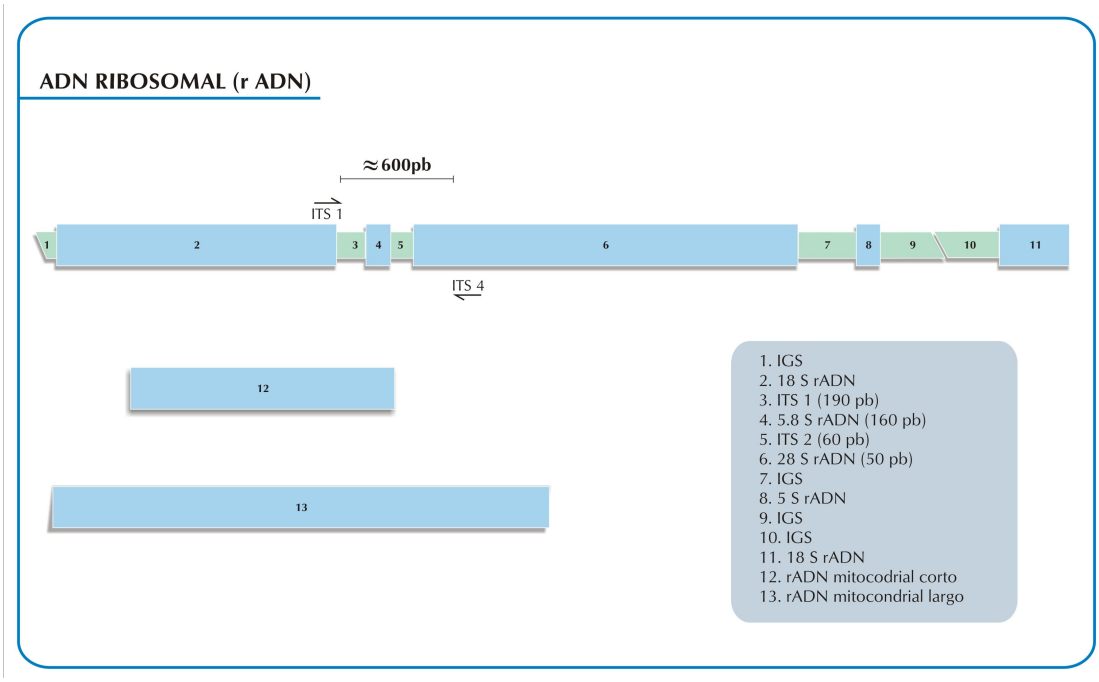


Figura 3.3 Mapa del rADN señalando los primers usados en la amplificación y el amplicón obtenido.

Tabla 3.1 Resultados del análisis de BLASTn de las secuencias de ITS

	Accesión	Descripción	Covertura ADN interés	E value	Max Identidad
ColH01	AJ301982.1	Colletotrichum acutatum 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene	81%	0	94%
ColH02	DQ454010.1	Glomerella acutata isolate Mj6 internal transcribed spacer 1,	97%	0	99%
ColH03	DQ454012.1	Glomerella acutata isolate Mj10 internal transcribed spacer 1,	91%	0	98%
ColH04	EF221832.1	Glomerella acutata isolate CIAD/GAQ-03 small subunit ribosomal	93%	0	99%
ColH05	DQ454010.1	Glomerella acutata isolate Mj6 internal transcribed spacer 1,	65%	0	95%
ColH06	AJ301982.1	Colletotrichum acutatum 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene	95%	0	99%
ColH07	DQ454010.1	Glomerella acutata isolate Mj6 internal transcribed spacer 1,	93%	0	99%
ColH08	DQ454010.1	Glomerella acutata isolate Mj6 internal transcribed spacer 1,	94%	0	99%
ColIg03	AB219019.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2,	95%	0	99%
ColIg04	EF423519.1	Glomerella cingulata isolate P013 internal transcribed spacer 1	95%	0	99%
ColIg05V	AF451905.1	Glomerella cingulata isolate CS89 18S ribosomal RNA gene, parti	99%	0	99%
ColIg07	EF423519.1	Glomerella cingulata isolate P013 internal transcribed spacer 1	95%	0	99%
ColIg10	DQ780450.1	Glomerella cingulata isolate Saprobe 73 18S ribosomal RNA gene	69%	3e -80	82%
ColIg11	DQ454018.1	Glomerella acutata isolate S2 internal transcribed spacer 1,	96%	0	98%
ColIg14	AB219019.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2,	95%	0	99%
ColIg19	EF423519.1	Glomerella cingulata isolate P013 internal transcribed spacer 1	96%	0	99%
ColIg24	EF423519.1	Glomerella cingulata isolate P013 internal transcribed spacer 1	96%	0	99%
ColIg31	EF423519.1	Glomerella cingulata isolate P013 internal transcribed spacer 1	95%	0	100%
ColIg38	AB219019.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2,	93%	0	99%
ColIg39	AB219019.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2,	94%	0	99%
ColIg45	EF423519.1	Glomerella cingulata isolate P013 internal transcribed spacer 1	69%	3e -80	82%
ColIg46	EF423519.1	Glomerella cingulata isolate P013 internal transcribed spacer 1	96%	0	99%
ColIg48	AB219019.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2,	94%	0	99%
Z1	AF534469.1	Colletotrichum kahawae from Zimbabwe 18S ribosomal RNA gene,	94%	0	99%
Q2	AF534469.1	Colletotrichum kahawae from Zimbabwe 18S ribosomal RNA gene,	92%	0	99%

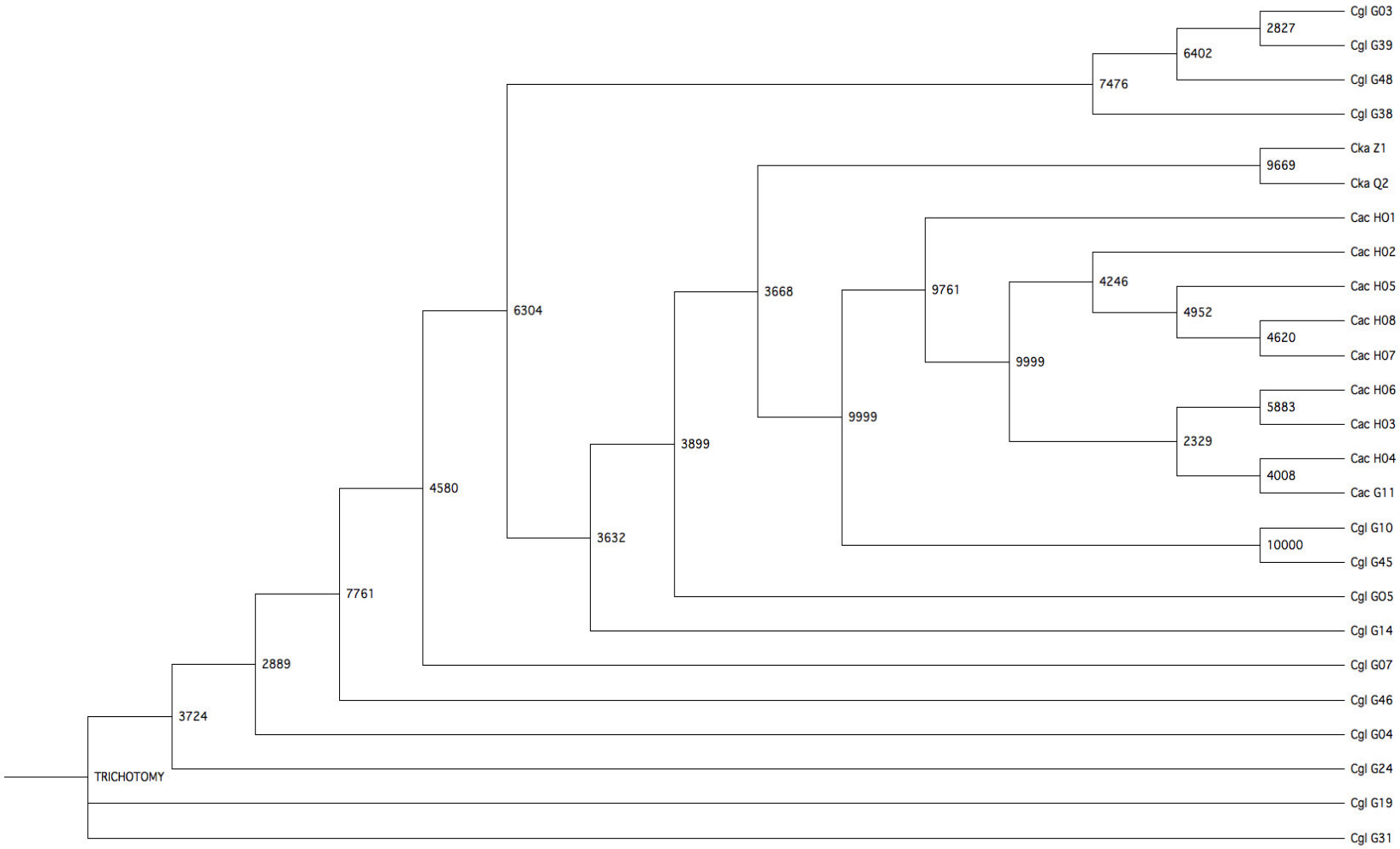


Figura 3.4 Dendrograma de la población en estudio obtenido a partir de las secuencias de ITS

3.3.3 Amplificación, Secuenciación y Anotación de β-tubulina.

Al usar la técnica de PCR para la amplificación de una parte del gen de la β-tubulina, usando los primers Bt-LEV-Lo1 y Bt-T2m-Up se obtuvo un fragmento de aproximadamente 900 pb, basándose en el marcador de peso molecular ΦX174 DNA/*Hae* III. El fragmento obtenido es el correspondiente a dos exones y un intrón del gen de β-tubulina (Figuras 3.2 y 3.5).

Con la anotación de las secuencias de β-tubulina se pudo hacer un acercamiento a la longitud y ubicación de los intrones y exones. La parte del gen de β-tubulina anotada comprendió parte de los exones 6 y 7 y el intrón F (Figura 3.5). En cuanto a exones 6 y 7 se pudo establecer una longitud media para todas las secuencias de 619 pb y 160 pb respectivamente, mientras que la longitud media del intrón F fue de 56 pb.

De los alineamientos realizados a las secuencias de ITS y β-tubulina, se observó una mayor variación de las secuencias a nivel interespecífico en la β-tubulina, ya que a lo largo de los alineamientos se encontraron diferencias en las tres especies de *Colletotrichum* spp., mientras que en las secuencias de ITS, las diferencias interespecíficas se presentaron solo en los intrones. La variación presentada en las secuencias de β-tubulina puede ser bien usada para diseñar primers que permitan una amplificación selectiva de las tres especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a café.

El análisis de BLASTn realizado a las secuencias sirvió para corroborar los resultados del análisis realizado a la región de los ITS ya que se obtuvieron los mismos resultados en cuanto a identificación de género y especie de cada aislamiento ya fuera de los aislamientos Colombianos o Africanos (Tabla 3.2).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el dendrograma construído a partir de las secuencias de β-tubulina (Figura 3.6) se pudo observar la formación de cinco grupos, tres de los cuales incluyen aislamientos de *C. gloeosporioides* y dos grupos de *C. acutatum* . En comparación al dendrograma obtenido con las secuencias de ITS, con los datos de β tubulina

se obtuvieron valores de Bootstrap similares aunque la distribución de los aislamientos fue diferente, es el caso de la tricotomia que aunque también se presentó en este árbol esta vez estuvo formada por los individuos Collg 46, Colg19, Collg04 y Collg24.

Al igual que en el análisis de ITS, se formó un grupo de *C. kahawae* dentro de la población de *C. gloeosporioides* y en este caso, durante la construcción del dendrograma, *C. kahawae* Z1 y Q2 siempre se agruparon, obteniendo el mayor valor de Bootstrap (10000), valor que se repitió mas que en el dendrograma anterior, posiblemente por que la longitud del amplicón que es de casi 300 pb mas largo que la secuencia de los ITS, aumentó la información genética para la construcción del árbol.

Ya que *C. kahawae* ha estado presente dentro del grupo de los individuos de *C. gloeosporioides* tanto para el dendrograma realizado con las secuencia de ITS como para este, se pensó que podrían existir organismos similares en los dos análisis sugiriendo la presencia de aislamientos colombianos estrechamente relacionados a *C. kahawae*, sin embargo al comparar los dendrogramas no se encontraron organismos cercanos en común entre los dos dendrogramas, indicandop la falta de información al usar sólo una pequeña porción del ADN genómico, siendo poco representativo para la distribución de la población.

3.3.4. Análisis Global

Para obtener un análisis interespecífico de los dos genes en la totalidad de la población se construyó un dendrograma uniendo las secuencias de ITS y β-tubulina de la población en estudio (Figura 3.7), en el que se presentó una mayor diversidad debido a la evaluación simultánea de los dos genes. Con este dendrograma también se probó que el análisis es más confiable que los construidos anteriormente ya que este útimo presentó entre los menores valores de Bootstrap el mas alto comparado con los otros árboles (i.e. 3995). En este dendrograma se evidenció la misma separación de los dos grupos

más grandes pertenecientes a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, aunque esta vez, en el caso de *C. acutatum* se observaron cuatro ramas principales, mientras que en el caso de *C. gloeosporioides* se evidenciaron siete ramas, de las cuales una pertenece al grupo de los *C. kahawae* Z1 y Q2. En el árbol consenso se mantuvieron los aislamientos de *C. gloeosporioides* del dendrograma de β-tubulina que estuvieron más cercanos al grupo donde se ubicó *C. kahawae*, indicando que la β-tubulina al ser un fragmento más grande, aportó más información en la construcción del dendrograma consenso.

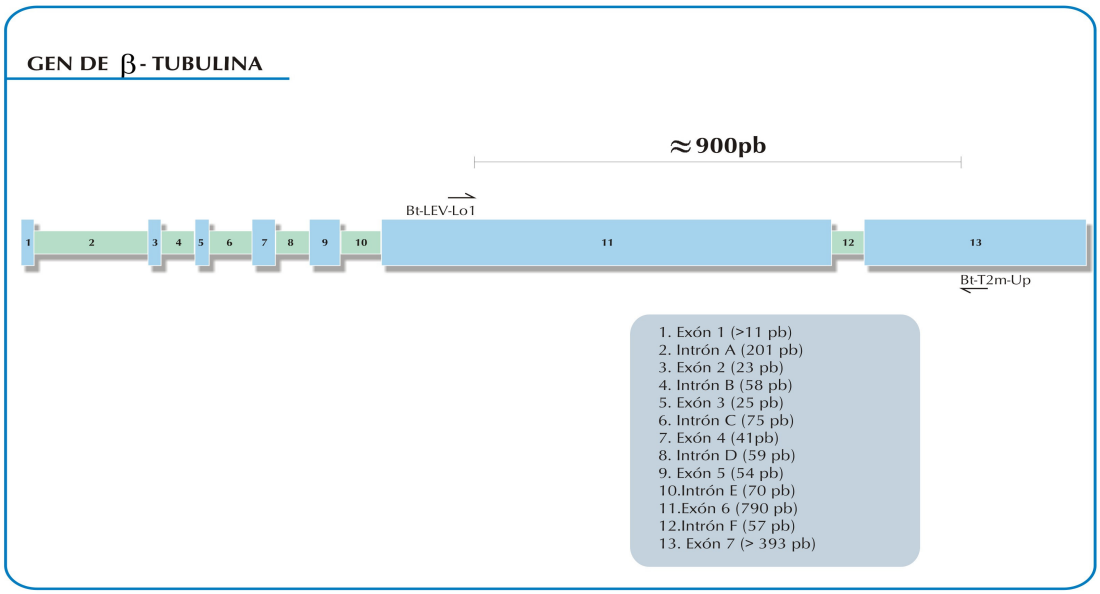


Figura 3.5 Mapa del gen de la β-tubulina mostrando los primers usados en la amplificación y la longitud del amplicón generado.

Tabla 3.2 Resultados de BLASTn para la amplificación de β-tubulina

	Accesión	Descripción	Covertura ADN interés	E value	Max Identidad
ColH01	AB273716.1	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds	61%	0	94%
ColH02	AB273716.1	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds	90%	0	94%
ColH03	AB273716.1	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds	91%	0	94%
ColH04	AB273716.1	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds	70%	0	93%
ColH05	AB273716.1	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds	91%	0	95%
ColH06	AB273716.1	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds	92%	0	94%
ColH07	AB273716.1	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds	90%	0	94%
ColH08	AB273716.1	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds	90%	0	94%
ColIg03	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	96%	0	97%
ColIg04	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	95%	0	98%
ColIg05V	DQ084508.1	Glomerella cingulata isolate L66 beta-tubulin 1 (TUB1) gene	54%	5e -114	83%
ColIg07	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	84%	0	84%
ColIg10	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	95%	0	92%
ColIg11	AB273716.1	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds	90%	0	95%
ColIg14	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	97%	0	94%
ColIg19	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	92%	0	99%
ColIg24	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	91%	0	99%
ColIg31	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	95%	0	96%
ColIg38	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	91%	0	99%
ColIg39	DQ084508.1	Glomerella cingulata isolate L66 beta-tubulin 1 (TUB1) gene	55%	8e -107	82%
ColIg45	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	88%	0	94%
ColIg46	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	96%	0	98%
ColIg48	U14138.1	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin	96%	0	98%
Z1	AY245020.1	Colletotrichum kahawae beta tubulin (BTUB2) gene, exons 6 and 7	91%	0	99%
Q2	AY245020.1	Colletotrichum kahawae beta tubulin (BTUB2) gene, exons 6 and 7	90%	0	100%

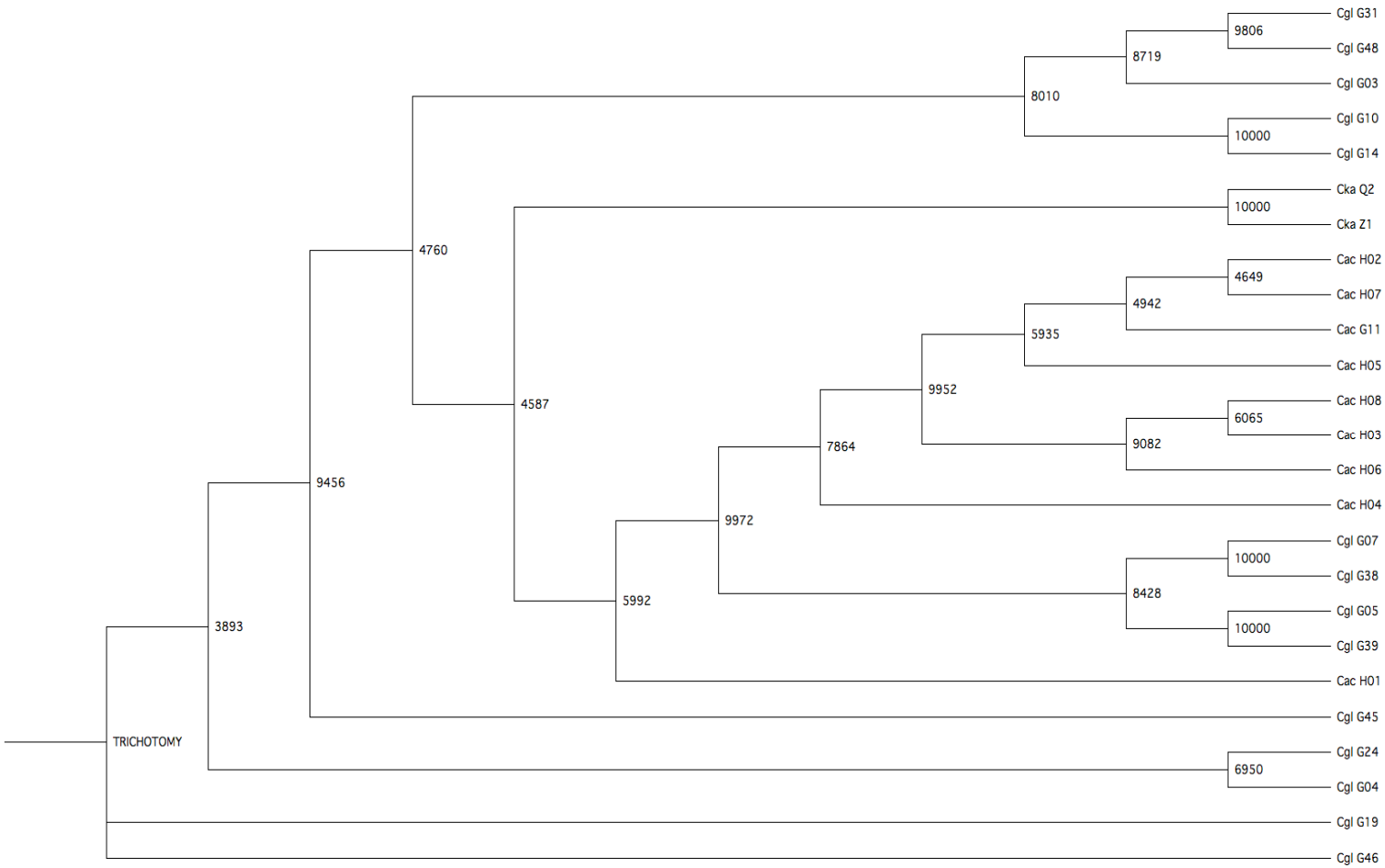


Figura 3.6 Dendrograma de la población en estudio obtenido de las secuencias de β-tubulina. Cgl: C. gloeosporioides: Gac: G. acutatum; Cka; C. kahawae. H: Huila; G: Granja Cenicafé.

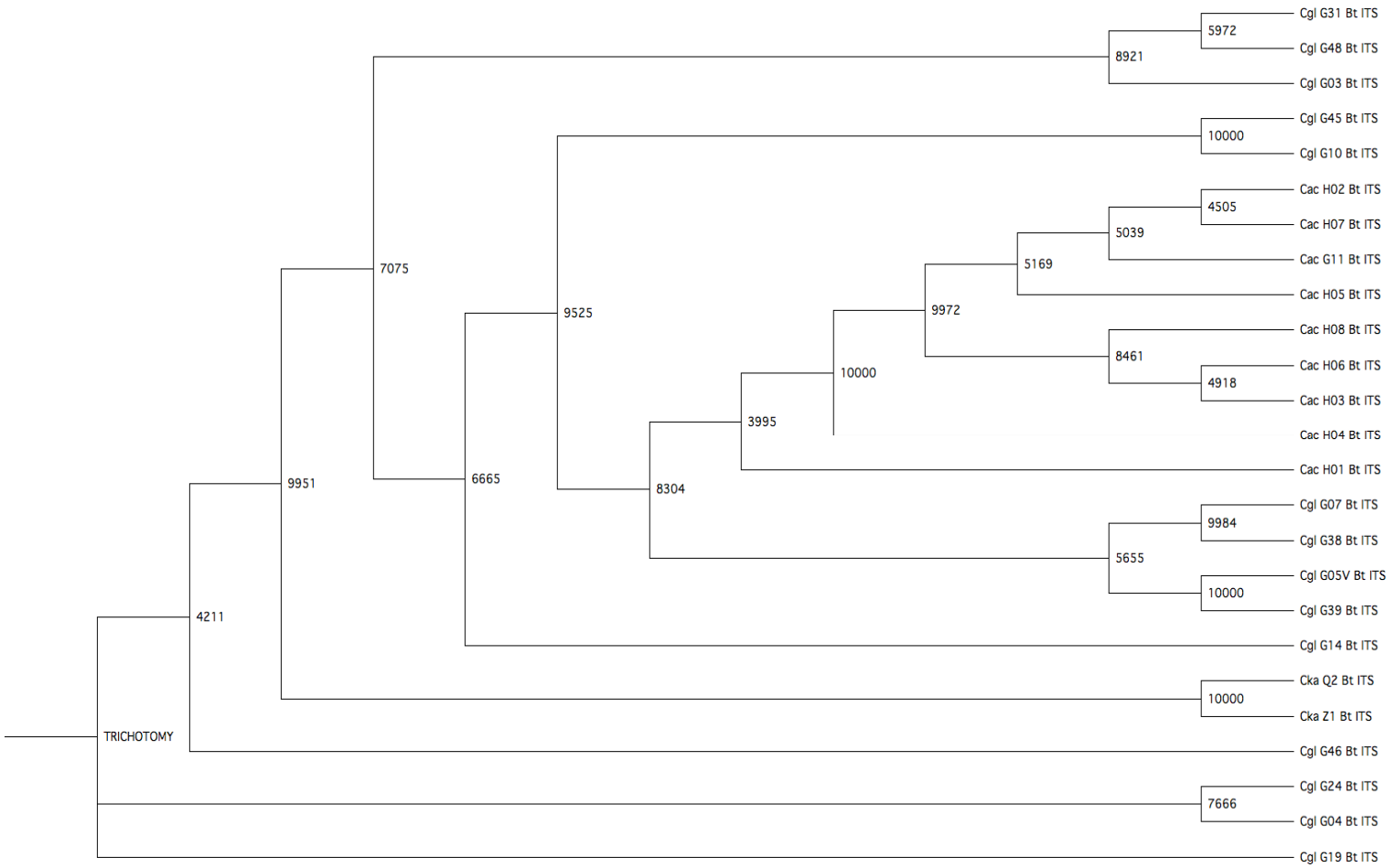


Figura 3.7 Dendrograma final de caracterización interespecífica de *Colletotrichum* spp. asociado a café, obtenido a partir de las regiones de rADN y β tubulina

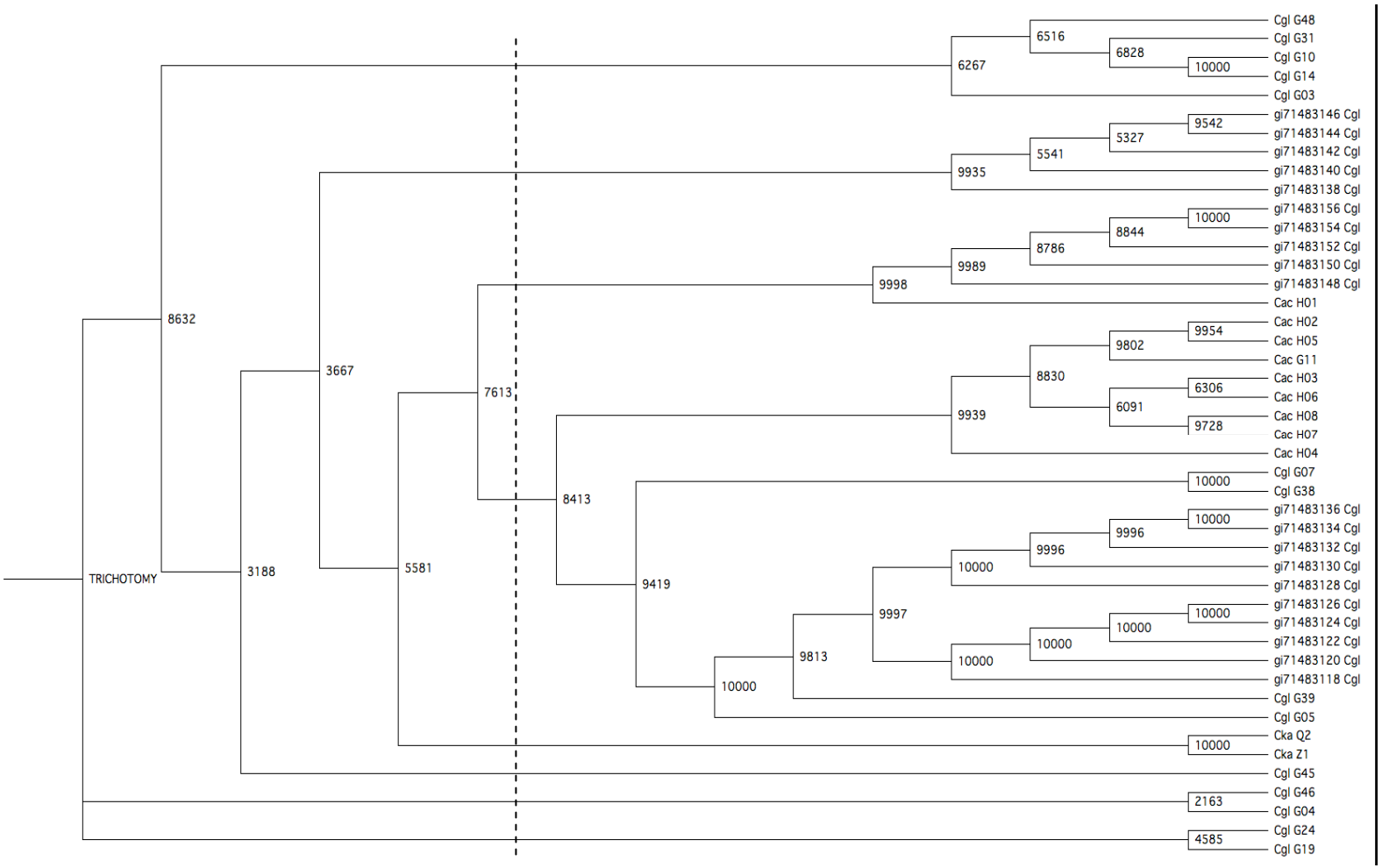


Figura 3.8 Comparación de las secuencias de β tubulina presentes en aislamientos colombianos de café y homologos en GenBank (gi). La linea punteada muestra el punto de separacion de *C. acutatum* (Cac) del *C. gloeosporioides* (Cgl) más cercano.

El hecho de que todos los *Colletotrichum* recuperados de tejido de La Plata (Huila), hubieran sido clasificados como *C. acutatum* mediante técnicas moleculares, puede ser debido a diferencias ambientales, ya que aunque el cultivo de origen de las muestras es tambien café, en este lugar predominan altas humedades, baja luminosidad (por la presencia continua de nubes) y recibe la influencia del Nevado del Huila por medio de vientos frios (Comunicación de la Disciplina de Agroclimatología de Cenicafé). En esta región, desde 1998 se está presentando una nueva enfermedad en café denominada "Chamusquina" que posiblemente está asociada a *Colletotrichum acutatum* (Castro et al., 2006).

En la mayoría de los estudios filogenéticos de los hongos se utilizan las secuencias entre los genes ribosomales debido a que están presentes como unidades repetidas en "tandem" con 60-200 copias por genoma haploide y evolucionan como una sola unidad (Swart, 1999; Mitchell *et al*., 1995); además, son regiones variables útiles para distinguir especies dentro de un mismo taxón (Sherriff *et al*., 1994), y en particular han sido utilizadas para resolver problemas en la sistemática del género *Colletotrichum* (Martín & Garcia, 1999), en *Fusarium* (Edel *et al*., 1997; Schilling *et al*., 1996, Donaldson *et al.,* 1995), *Aspergillus* (Kumeda & Asao, 1996), y en *Mycosphaerella* (Crous & Kang, 2001) entre otros. También son utilizados en estudios a nivel molecular dedicados a la sistemática, evolución, análisis de poblaciones o en la identificación de individuos (Abang *et al.,* 2002; Manaut *et al.,* 1998 y 2001; Martín & Garcia, 1999; Kenneth *et al*., 1999; Ristaino *et al*., 1998; Sreenivasaprasad *et al*., 1993). Aunque las regiones ITSs representan solo una parte del genoma, estas regiones son suficientemente variables para facilitar la separación a nivel de género y son frecuentemente útiles a nivel de especies en los ascomycetes (White *et al*., 1990).

En la caracterización interespecífica de *Colletotrichum* asociados a café, solo fue posible identificar dos especies presentes en Colombia, *C. gloesporiodes* y *C. acutatum*, y diferenciarlas de *C. kahawae*. En todos los análisis se aprecia la alta diversidad intraespecífica de *C. gloeosporioides*, que en un momento puede sugerir la existencia de especies crípticas dentro de la misma clasificación taxonómica. Para profundizar en esta interpretación, se incluyeron en el análisis secuencias de *C. goeosporioides* de Genbank, generándose el dendrograma de la Figura 3.8. Al nivel de la separación de la especie *C. acutatum* de C. gloeosporioides, se forman siete grupos de los cuales uno corresponde a C. acutatum y otro a C. kahawae. Un grupo mayor, cercano a *C. acutatum*, contiene secuencias de *C. gloeosporioides* tanto de aislamientos colombianos como de GenBank. Sin embargo, tres grupos con buen soporte, se presentan independientemente, conteniendo solo secuencias de GenBank (2) o de aislamientos de zona cafetera (1). Finalmente se tienen los aislamientos de la tricotomía y con bajo soporte (5) que corresponden a aislamientos colombianos, pero muy alejados del grupo principal (G45, G46, G04 , G24 y G19). Esta caracterizacion intraespecífica justifica entonces un análisis mas profundo, utilizando marcadores que cubran el genoma completo, lo que se tratará en el siguiente capítulo.

3.4. REFERENCIAS

Abang, M.M., Winter, S., Green, K.R., Hoffmann, P., Mignouna, H.D., and Wolf, G.A. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. Plant Pathology 51**:** 63-71

Altschul, S.F., Madden T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Blattner F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado, J., Glasner, D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science. Vol. 277. 1453-1462.

Bruns, T.D. & Shefferson R.P. 2004. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. Canadian Journal of Botany. 82: 1122-1132.

Castro C., B.L.; Marin J., J.A.; Valdes G., S.P.; Gaitan B., A.L. 2006 Avances en la etiología de la chamusquina, nuevo disturbio en cafetales de zonas altas del departamento del Huila. In: CONGRESO de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencia Afines, 27. Cartagena (Colombia), Septiembre 12-16. 2006. Resúmenes.

Chen, B.J. & Janes, H.W. 2002. PCR cloning protocols. Methods in Molecular Biology. Volume 192. Second Edition. Humana Press. New Jersey. 439 p.

Crous, P.W., and Kang, J.C 2001 A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. Mycologia 93: 1081 - 1101

Donaldson, G.C., Ball, L.A., Axelrood, P.E., and Glass, N.L 1995. Primer set developed to amplified conservated genes from filamentous ascomycetes are useful in diferentiating *Fusarium* species associated with conifers. Applied and environmental Microbiology 61: 1331 – 1340.

Edel, V., Steinberg, N., Gautheron, N., and Alabouvette, C. 1997 Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR) amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. Mycological Research 101:179 - 187

Kenneth, S., Bell, J.R.,Roberts, J., Verral, S., Cullen D.W., Williams, N.A., Harrison, J.G., Toth, I.K., Cooke, D.D.L., Duncan, J.M., and Claxton, J.R. 1999. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f.sp *subterranea* in soil and on tubers using specific PCR primers. . European Journal of Plant Pathology 105: 905 –9 15.

Kumeda, H & Asao, T. 1996. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to diferenciate species of *Aspergillus* section *flavi*. Applied Environmental Microbiology 2947– 2952.

Lee, S.,& Taylor, J. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and singles spores. En: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. PCR Protocols. A guide to metohds and applications. Academic Press. San Diego. USA. 482 p.

Manaut, F., Hamaide, N.,Vander, Stappen J., and Maraite, H. 1998. Genetic relationship among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. in Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA markers. Plant Pathology 47: 641 – 648.

Manaut, F., Hamaide, N., and Maraite, H 2001 Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* from native Mexican *Stylosanthes* species Plant Pathology n50: 383 - 396

Martin, M.P., and Garcia- Figueres, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. European Journal of Plant Pathology 105: 733 – 741.

Meyer, W., Kock, A., Niemann, C., Beyermann, B., Epplen, J.T., Börner, T. 1991. Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. Current Genetics 19:239-242.

Mitchell, J.I., Roberts, J.P., and Stephen, T.M. 1995. Sequences or structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. Mycologist 9: 65 – 67.

Promega,2006. Life Science Catalog. Madison, WI. USA. 406 p.

Ristaino, J.B., Madritch, M., Trout, C.L., and Parra, G. 1998. PCR Amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. Appl. Envirom. Microbiol 64 (3) 948 – 963.

Schilling, A.G., Möller, E.M., Geiger, H.H. 1996. Polymerase chain reaction based assays for species – species detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. Phytopathology 86: 515 – 522.

Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnol, G.M., Lafay, J.F., Brygoo, Y., and Bailey, J.A. 1994. Ribosomal DNA sequences analisys reveals new species grouping in the genus *Colletotrichum*. Exp. Mycol. 18:121 – 138.

Sreenivasaprasad, S., Brown, A., and Mills, P.R. 1993. Coffee Berry Disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. Mycological Research 97 (8): 995 – 1000.

Swart, G. M. 1999. Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from Avocado and Mango. Degree of Doctor of Philosophy. University of Pretoria. Faculty of Biological and Agricultural Sciences. Department of Microbiology and Plant Pathology. Pretoria. 193 p.

Villa, N.O., Kageyama, K., Asano, T., Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS, rDNA, cytochrome oxidase II, and β-tubulin gene sequences. Mycologia, 98 (3), pp. 410-422.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR portocols: A guide to methods and ampliffications. (Ed. Innis, M.A., Gelfanda, D.H., Sninsky, J., White, J.T.) Academic Press. New York.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN INTRAESPECÍFICA DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp.

1.1 INTRODUCCIÓN

La aplicación de marcadores moleculares en la taxonomía de hongos promete aclarar las relaciones genéticas entre grupos de hongos fitopatógenos. Esto es especialmente importante en taxones como *Colletotrichum*, el cual no está claramente caracterizado por su morfología. En la actualidad el número de especies pertenecientes a este género es aún un interrogante (O'Neill *et al*, 1997).

A pesar de que el estudio de genes individuales ha servido en algunos casos para la caracterización interespecífica de una población, la mejor alternativa para acometer el problema es obtener información de muchos más loci a largo del genoma, lo que además de una separación confiable de las especies, permite resolver con mayor detalle las diferencias al interior de las mismas, en las poblaciones que la conforman.

Este objetivo puede cumplirse con el uso de herramientas tipo marcadores moleculares, que tienen significancía sobre el ADN total de un individuo. Con el uso de estos marcadores moleculares se pueden generar caracterizaciones detalladas de de cada uno de los individuos de la población en estudio, que permitan identificar patrones clonales dentro de las poblaciones, así como determinar la profundidad de las similitudes que sugieren los estudios de loci individuales, en este caso entre *C. kahawae* y

los aislamientos màs cercanos de la población en estudio de *C. gloeosporioides*.

En este trabajo, los RAPDs fueron usados en la etapa preliminar de la caracterización intraespecífica por ser una técnica sencilla en la que se obtiene un alto número de fragmentos con bajos costos unitarios por ensayo; sin embargo, para efectos de mejorar la reproducibilidad y la resolucion, se complementó con la obtención de marcadores mas robustos como los AFLP (Penner *et al*, 1993) .

Un mayor conocimiento de la distribución de la población puede facilitar el diseño de herramientas para el diagnóstico de cualquiera de estas tres especies de *Colletotrichum* asociadas a café.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Caracterización RAPDs.

Para establecer la diversidad de la población en estudio, se evaluaron marcadores de bajo costo como son los RAPDs. Los oligonucleótidos usados para la amplificación al azar del ADN de la población fueron PALF215 (5' TGA AGT CCA TGG TTA GGT GAG TCC 3'), PALRN928 (5' CCA TGG CTT GCA GCT TTC TGT GTT CAG GAT T 3') y PALF251 (5' GAA TAG GTG ATG GTT GTA GCA GTC CA 3').

Se realizó una estandarización de la concentración adecuada de $MgCl_2$ a usar en el coctel de PCR, tomando valores de concentración final de $MgCl_2$ entre 1.5mM y 3.0mM. La menor concentración de $MgCl_2$ que produjera el mayor número de bandas en cada organismo, fue la concentración usada para realizar las amplificaciones de los tres primers en la población en estudio.

En un volumen final de 25µl por reacción, se usó un coctel de PCR con concentraciones finales del primer de 0.8µM; 1X de Buffer de PCR; 0.2 mM de dNTP's; 1U *Taq* Polimerasa, 25ng de ADN genómico y la concentración elegida de $MgCl_2$ mediante la curva de estandarización antes realizada. La amplificación se llevó a cabo realizando una denaturación inicial a 94°C por 5 min, 40 ciclos con una denaturación a 94°C durante 1 min, un anillaje del primer a 36°C por 1 min, una extensión a 72°C durante 2 min y una extensión final a 72°C por 5 min. El producto de PCR se observó por electroforesis en un gel de Agarosa 2% teñido con Bromuro de Etidio.

4.2.2 Caracterizacion con AFLPs

Mediante marcadores AFLP se generó una "huella dactilar" del genoma de cada aislamientos colombianos, además de las cepas Z1, Q2 y Ca1 de *C. kahawae* y de *C. gloeosporioides* Mal1 provenientes de África, aportadas por el Dr. Vitor Várzea del CIFC (Oeiras, Portugal). Con este fin se siguió el

protocolo descrito por el “AFLP Microorganism Primer Kit” (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) aunque con las siguientes modificaciones: la concentración de ADN para todos los aislamientos fue de 10 ng/ul, utilizando 90 ng de cada cepa en total para la digestión durante 3 horas con las enzimas de restricción EcoRI y MseI; se usó un volumen final de 25ul en la reacción de ligación de los adaptadores, se agregaron 24 ul de solución con los adaptadores y 1ul de DNA T4 Ligasa a cada muestra digerida. Luego de 3 horas de incubar a 4℃ se realizó la preamplificación usando los primers E-0 y M-0. Para realizar un posterior amplificación selectiva se diluyó el amplificado 1:25. En esta segunda amplificación se utilizaron las combinaciones de primers (M-A, E-AC) y (M-C , E-AC).

Los productos de PCR se separaron en un gel de poliacrilamida al 4% (420 g de urea en 450 ml de ddH2O y 100ml de TBE 5x), agregando por filtración 100ml de acrilamida/bis-acrilamida (19:1) al 40%. Para la polimerización del gel se utilizaron 250ul de APS al 10% y 60 ul de TEMED. La electroforesis se realizó a 2000 V, 90 W durante 2 horas, utilizando 5 ul de la reacción de preamplificación. La fijación se llevó a cabo con ácido acético glacial al 10% y después el gel se tiñó con Nitrato de Plata durante 40 minutos. Luego de revelar las bandas de ADN con solución de revelado (60g de Na2CO3, C6H4(CH3)2 al 37%, 10mg/ml de tiosulfato de sodio, 2000ml de dH2O), se detuvo la reacción con ácido acético glacial en etanol absoluto, dejando secar el gel durante 12 horas a temperatura ambiente para su documentación con escáner.

4.2.3 Analisis de Resultados

Para cada tipo de marcador, RAPD o AFLP, se creó una matriz binaria, donde las filas correspondieron a un marcador definido por los primers que lo amplificaron y por su peso molecular, mientras que las columnas correspondieron a los genotipos. Para cada posición *ij* se asignó el valor de “1” cuando estuvo presente el marcador *i* en el genotipo *j*, y “0” cuando

estuvo ausente. La matriz binaria generada se utilizó para un análisis de Coordenadas Principales (PCOORDA) con el software INFOSTAT y para generar un dendrograma por análisis de conglomerados usando el paquete Treecon for Windows versión 1.3b.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSÍON

4.3.1 Genotipificación de aislamientos de *Colletotrichum* con marcadores RAPD.

Al realizar la curva de $MgCl_2$ para estandarizar la técnica se observó que la concentración de óptimo desempeño de la PCR es de 2.5 mM (Figura 4.1).

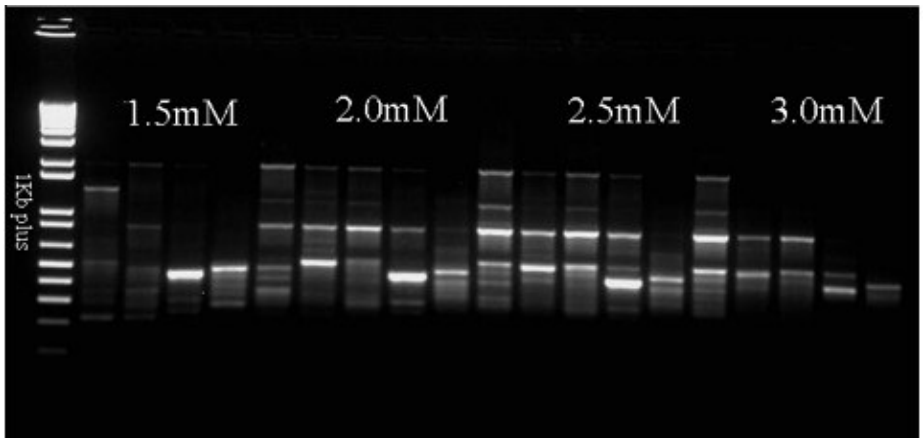
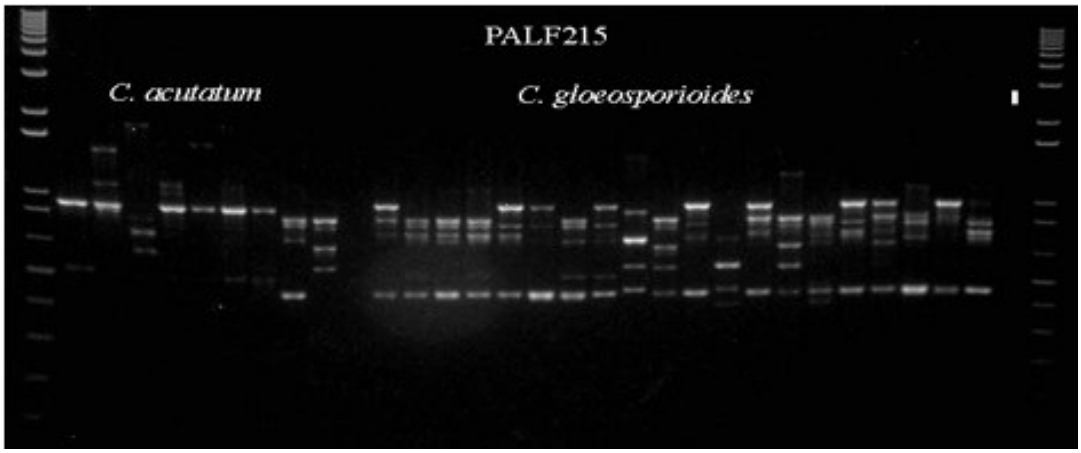


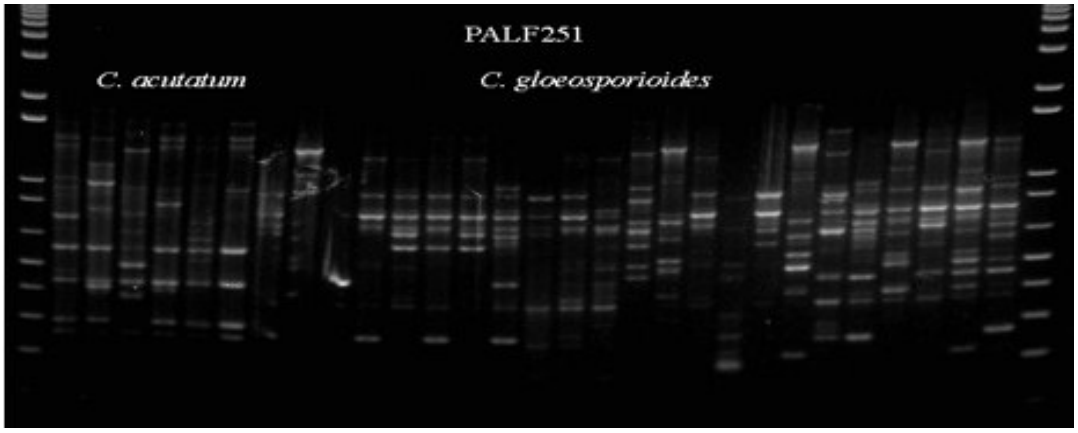
Figura 4.1 Curva de estandarización de concentración de $MgCl_2$ (desde 1.5mM hasta 3.0mM) para amplificación de marcadores RAPD en *Colletotrichum* spp.

Con los tres primers usados se obtuvieron en total 84 marcadores (Figura 4.2), de los cuales el primer PALF251 fue el que presentó el mayor número de bandas (32 marcadores).

.A.



B.



C.

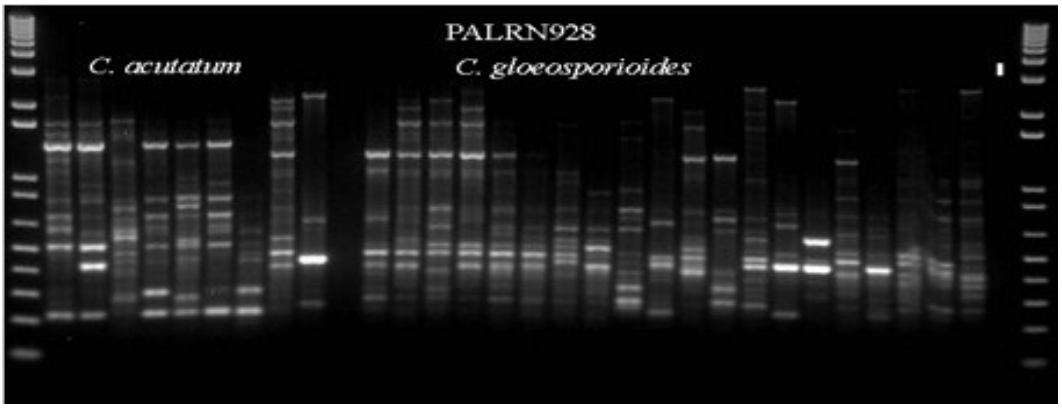


Figura 4.2 Patrones de Bandeo de RAPDs generados con los primers PALF215 (A), PALF251 (B) y PALRN928 (C).

El dendrograma resutante (Figura 4.3), presenta ramas que agrupan tanto a una especie como a la otra, pero estas ramas aparecen dispersas, en especial la que contiene a *C. acutatum* H04 y H07, muy alejada del resto de aislamientos de esta especie. Estas inconsistencias pueden ser debidas a la falta de resolución del dendrograma, que a la vez se ve reflejada en los bajos valores de bootstrapping obtenidos. Además de no detectarse individuos con el mismo patrón genético, se observa la diversidad de aislamientos de *C. gloeosporioides,*. El uso de marcadores RAPD permitió hacer una aproximación preliminar a la diversidad de la población, corroborando la variabilidad fenotípica observada en los medios de cultivo. Esta diversidad poblacional era adecuada para continuar con el desarrollo de matrices de marcadores AFLPs.

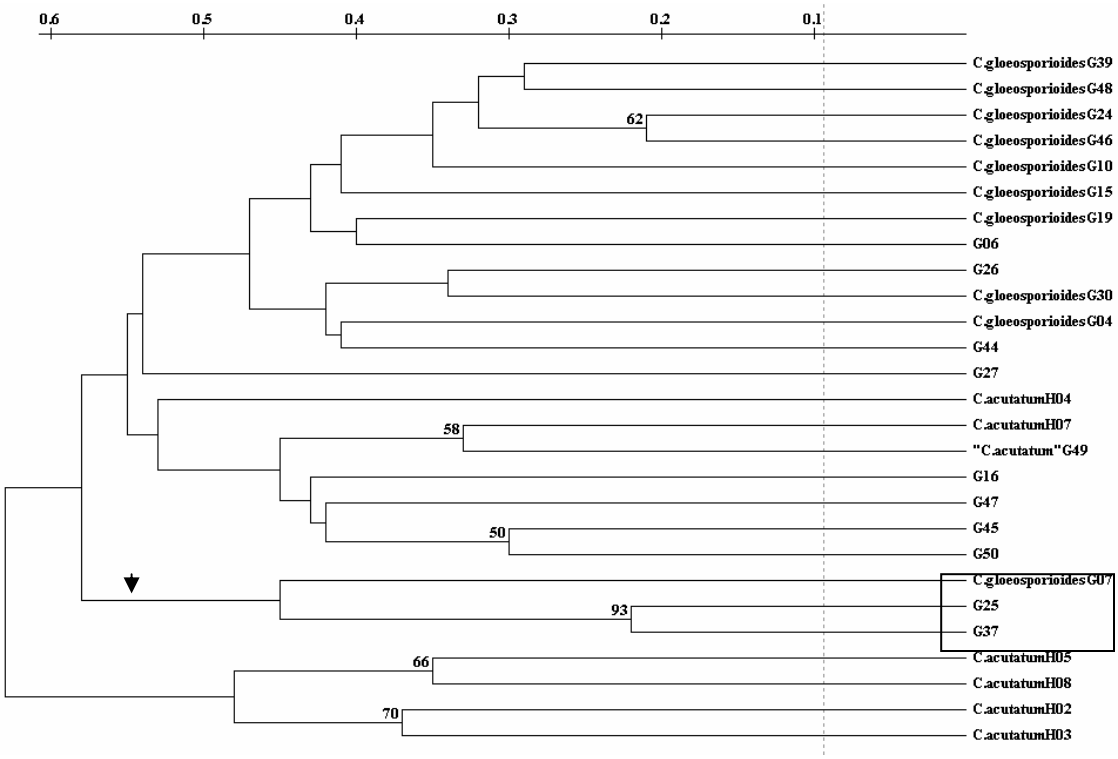


Figura 4.3 Dendrograma concenso obtenido del análisis de las tres matrices binarias de los marcadores encontrados en RAPD, con los datos de Bootstrap más altos.

4.3.2 Genotipificación de aislamientos de *Colletotrichum* con marcadores AFLP.

Se iniciaron los trabajos de caracterización genotípica con la técnica de AFLPs, ya que por la mayor cantidad de marcadores generados permiten realizar un estudio molecular más profundo para determinar la variabilidad genética y confirmar los resultados de las caracterizaciones realizadas por RAPDs y por la amplificación de genes de ITS y β-tubulina. En un inicio se evaluaron únicamente los aislamientos colombianos con las combinaciones E-AC/M-A, E-AC/M-C, recomendadas por el "AFLP Microorganism Primer Kit" (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) para estudios con *Colletotrichum,* y con un muy buen patrón de bandeo en un estudio que realizaron de caracterización genetica de *Colletotrichum* en Alfalfa (O'Neill *et al*, 1997); adicionalmente se evaluó la combinación E-TA/M-C. Con todas las combinacones de obtuvieron buenas amplificaciones (Figura 4.4). El aislamiento Collg07 presenta patrones de bandeo muy diferentes al grupo de *C. gloeosporioides*, pero adicionalmente se observan patrones divergentes dentro de *C. acutatum* que corresponden a uno de los grupos observados con RAPDs.

En el dendrograma construido de la matriz binaria de los AFLP (Figura 4.5), se pudo lograr la separación de las especies de los aislamientos colombianos de *Colletotrichum* spp. Como se oberva en el dendrograma, la mayoría de las ramas se encuentran soportadas por datos muy altos de Bootstrap, respaldados por la cantidad de información que arrojó el uso de marcadores AFLP.

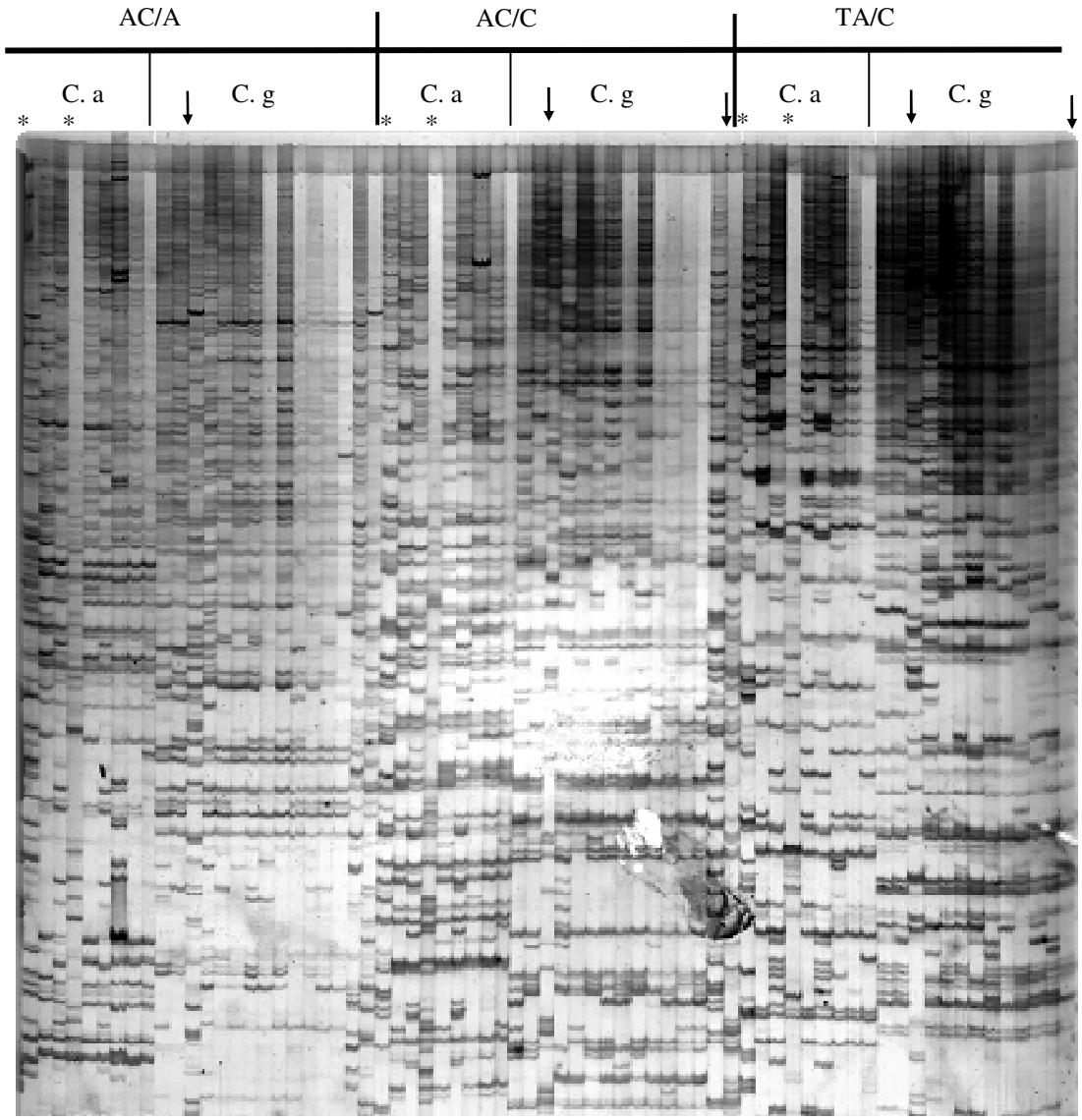


Figura 4.4. Patrones de Bandeo de AFLP generados con las combinaciones de primer E-AC/M-A, E-AC/M-C y E-TA/M-C en *Colletotrichum* spp. Flechas: Aislamiento G07 y G25. Asteriscos: patrones divergentes de *C. acutatum*.

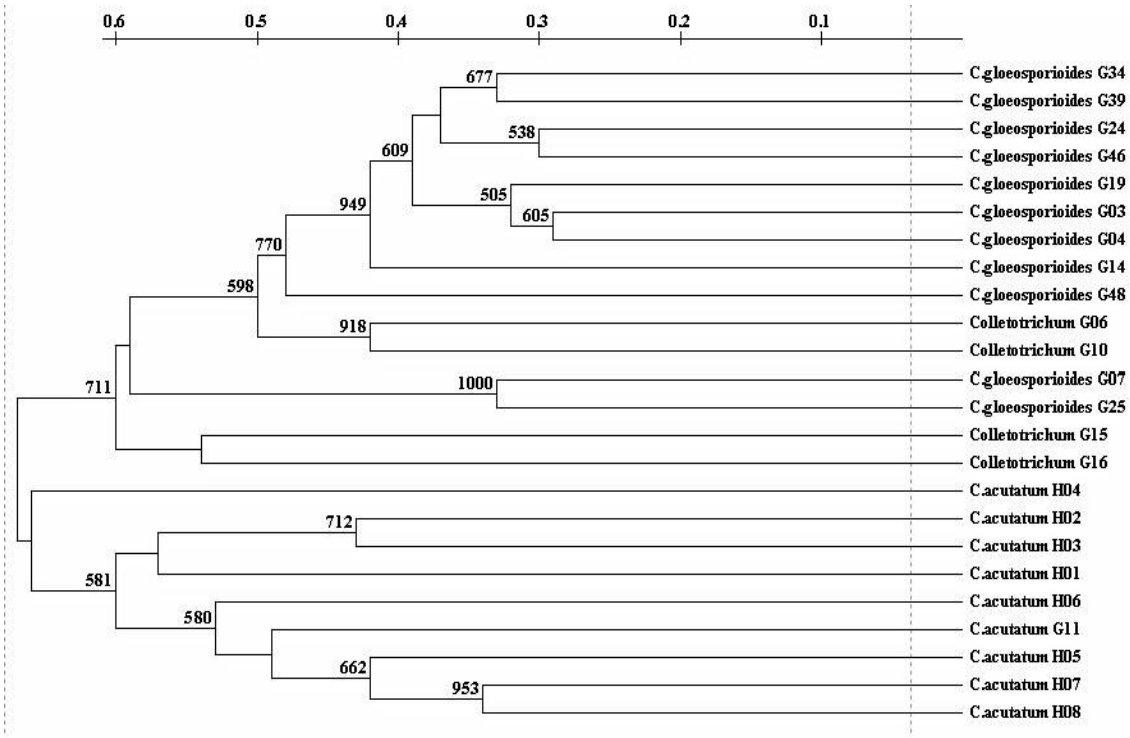


Figura 4.5 Dendrograma construido a partir de marcadores AFLP de aislamientos de *Colletotrichum* spp. colombianos asociados a café.

Una vez se tuvo acceso al ADN de los aislamientos de *C. kahawae*, proveniente de varios países africanos, se evaluó junto con los aislamientos colombianos, las mismas combinaciones de primers usadas anteriormente, obteniendose un patrón de corrido como se observa en la Figura 4.6. De las tres combinaciones de primers evaluadas, E-AC/M-C fue la combinaciòn que arrojó más bandas. De la totalidad de las combinaciones se obtuvieron 348 marcadores entre polimórficos y monomórficos, que comparado con las 84 bandas obtenidas con los marcadores RAPDs, hace a esta técnica un método más eficaz y confiable para realizar estudios de caracterización poblacional.

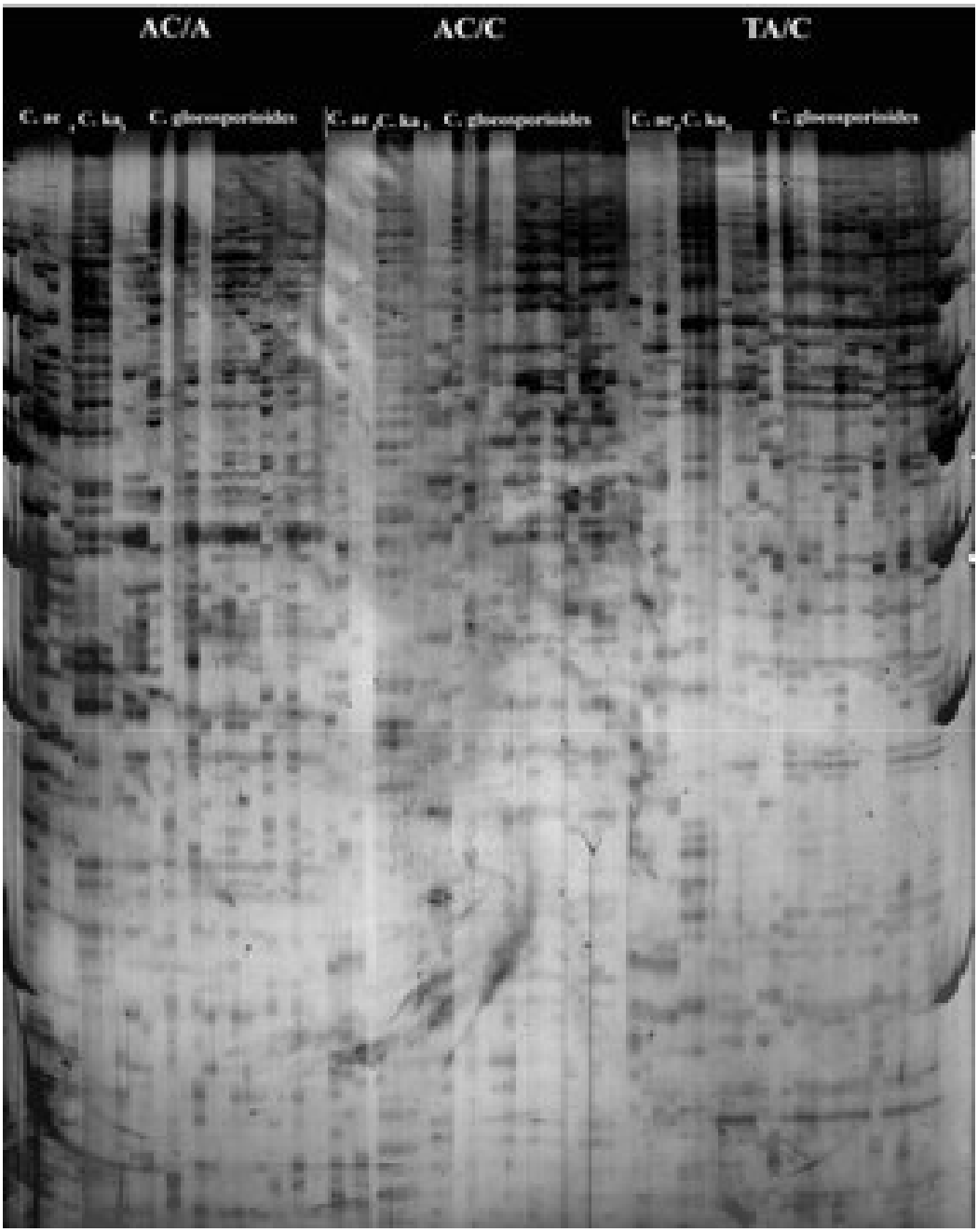


Figura 4.6 Patrones de bandeo de AFLP generados con las combinaciones de primers E-AC/M-A, E-AC/M-C y E-TA/M-C con individuos de *Colletotrichum* spp. colombianos y africanos (CIFC).

Con la información obtenida por estos marcadores, se construyó un dendrograma (Figura 4.7) en el cual se observaron cuatro grupos; el de *C. acutatum*, el grupo más grande que es el de *C. gloeosporioides*, el grupo de *C. kahawae* procedentes de África, que en este árbol se encuentran agrupados con el aislamiento colombiano Collg05V, quien durante al análisis interespecífico por medio de ITS o intraespecífica por AFLP, se mantuvo como el aislamiento colombiano más cercano al grupo de *C. kahawae*. El último grupo de este dendrograma es el del aislamiento africano de *C. gloeosporioides* que se encuentra más lejos de *C. kahawae* que el organismo Collg05V, que se comporto como un *outgroup* para la especie *C. gloeosporioides.*

En este último dendrograma de AFLP es posible evidenciar una falta de información para tener una adecuada separación de los aislamientos del grupo de *C. gloeosporioides*, reflejado en algunos valores bajos de Bootstrap. Sin embargo, comparando los individuos de este árbol con el dendrograma de la figura 4.5, se mantiene una buena distribución de los organismos, puesto que algunos *C. gloeosporioides* conservan sus lugares dentro del árbol o al menos conservan sus individuos más cercanos.

Tal como se vio a lo largo de toda la caracterización, el grupo de *C. kahawae* se hizo notar siempre por los valores de Bootstrap más altos, lo que indica que aunque este grupo se encuentre dentro de los *C. gloeosporioides*, es un grupo muy sólido y en todos los casos siempre estos individuos van a estar juntos.

El análisis de PCOORDA (Figura 4.8) confirma las agrupaciones obtenidas en el dendrograma. Se aprecia la ubicación intermedia entre el aislamiento M1 y la especie *C. acutatum*, así como la del aislamiento G05V y la especie *C. kahawae*.

Durante todo el análisis de caracterización molecular inter e intraespecífica, se mantuvo la cercanía entre *C. kahawae* y *C. gloeosporioides*. A lo largo del análisis molecular no se encontraron aislamientos iguales o con una similitud

del 100% lo que sugiere que en la naturaleza se debe mantener principalmente la fase sexual del hongo, permitiendo así la existencia de un género con una diversidad genética muy amplia hasta en niveles intraespecíficos.

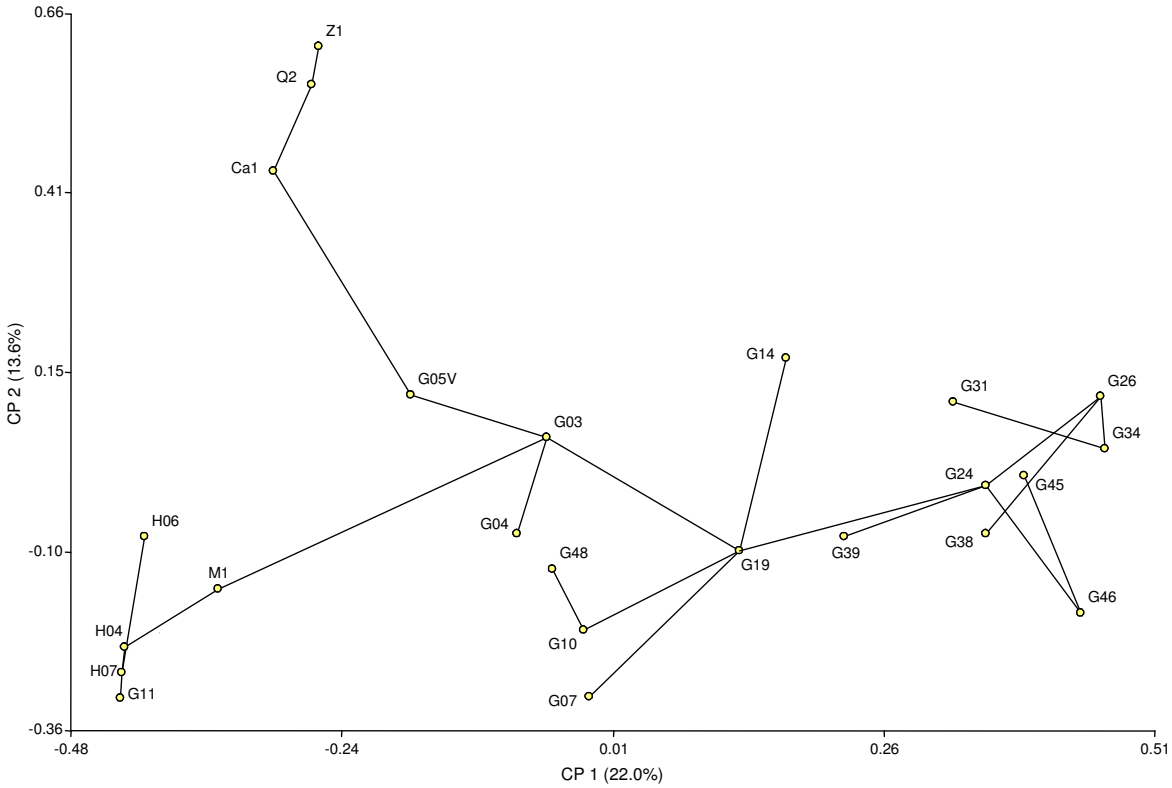


Figura 4.8 Análisis de Coordenadas Principales con Árbol de Recorrido Mínimo. Para cada uno de los dos componentes se presenta el porcentaje de variabilidad correspondiente. Distancia Manhattan promedio.

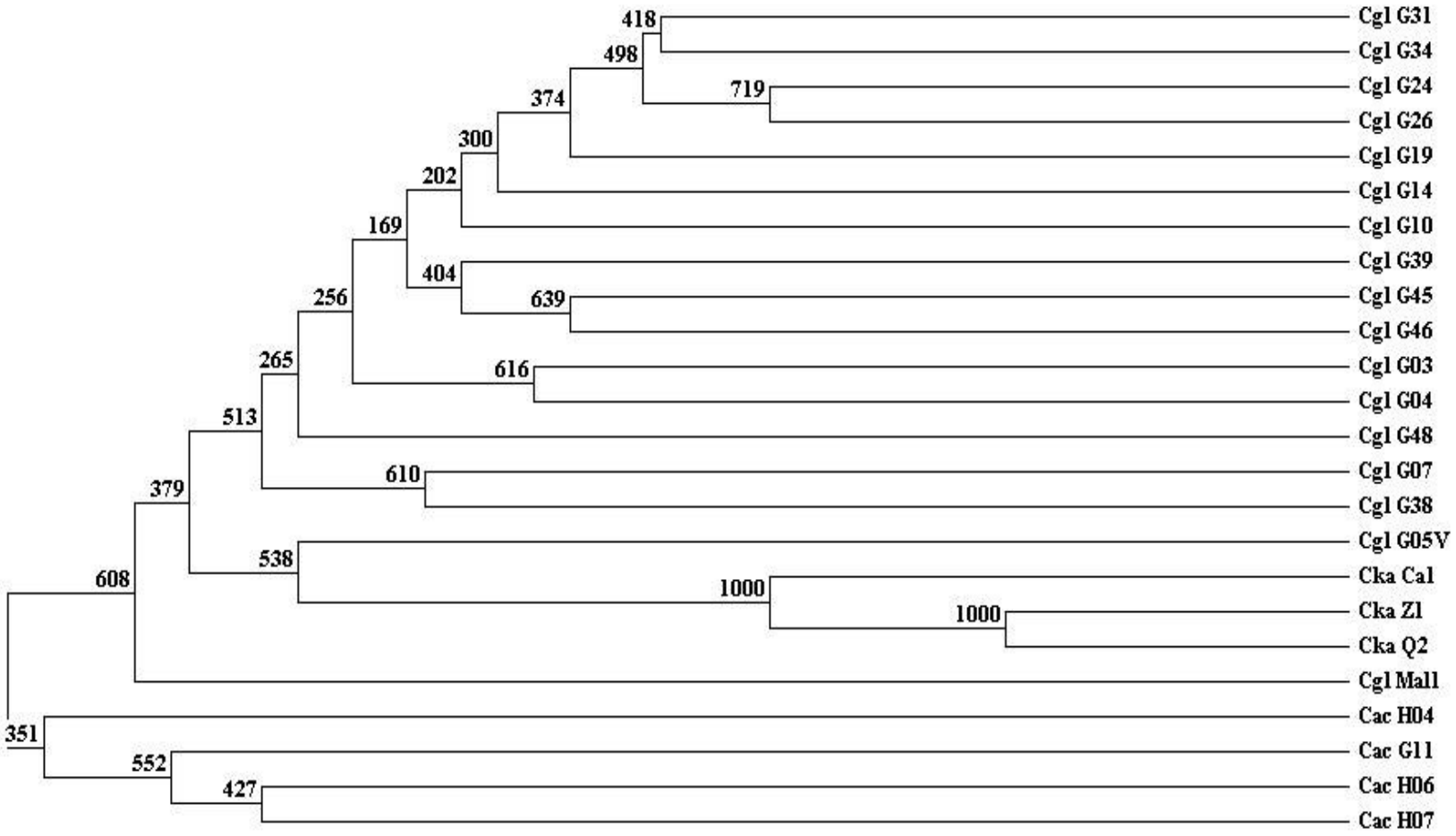


Figura 4.7 Dendrograma obtenido de marcadores AFLP de aislamientos colombianos y africanos.

4.4 REFERENCIAS

O'Neill, N.R., van Berkum, P., Lin, J.J., Kuo, J., Ude, G.N., Kenworthy, W. And Saunders, J.A. 1997. Application of Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism for Genetic Characterization of *Colletotrichum* pathogens of Alfalfa. Phytopathology Vol. 87, No. 7. 745-750.

Penner, A.G., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S.j. and Fedak, G. 1993. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR methods and applications. 2: 341-345.

Van de Peer, Y., De Wachter, R.1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput. Applic. Biosci. 10, 569-570.

CAPITULO V

EVALUACIÓN DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE *Colletotrichum* spp. ASOCIADAS A CAFÉ

1.1 INTRODUCCIÓN

La PCR se ha convertido en una herramienta atractiva para la detección de microorganismos específicos en campos como la ecología microbiana y la fitopatología en la que se han desarrollado primers que reconozcan especies específicas (Bulat *et al*, 2000).

Los criterios taxonómicos utilizados para diferenciar las especies del género *Colletotrichum* se basan principalmente en la forma y tamaño de los conidios, la formación del apresorio y las características que presenta en medio de cultivo, como tasa de crecimiento, color de la colonia y formación de estructuras como esclerocios y matriz mucilaginosa. Sin embargo, este tipo de características son altamente variables, dependen del medio de cultivo, el pH y la temperatura (Estrada *et al*., 2000). Por la actividad enzimática en medio sólido con tartrato o citrato como única fuente de carbono, se ha diferenciado *C. gloeosporioides* de *C. kahawae* (Waller *et al*., 1993). De otro lado, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* presentan diferencias en la actividad proteasa en medio sólido (Martin & Garcia, 1999).

Debido a la gran variabilidad de las características morfológicas, la relativa inestabilidad en las pruebas bioquímicas, la lentitud y relativa dificultad que implican las pruebas de patogenicidad, en la actualidad se utilizan técnicas moleculares para el estudio del genoma de un individuo o una población. Las

pruebas moleculares son útiles actualmente para la identificación de especies, y sistemática en muchos organismos.

Con la evaluación de métodos bioquímicos y moleculares en la población en estudio, se espera encontrar una herramienta confiable y de fácil diagnóstico para las tres especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a café.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Prueba de hidrólisis de caseína

Con el ánimo de probar una forma de diferenciación entre *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, basándose en una prueba bioquímica, se prepararon placas de Agar de Hidrólisis de Caseína de acuerdo con Paterson & Bridge, 1994. (Anexo 5.1) y se sembraron varios aislamientos puros de la población en estudio según Martín & García, 1999. Los hongos fueron incubados a 28°C durante 72 horas, tiempo en el cual se determinó la existencia o no de un aclaramiento o halo de proteólisis. La prueba se consideró positiva en las placas que presentaron halo transparente alrededor del hongo en crecimiento y se consideró negativa para la ausencia de este halo alrededor del hongo (Eckstein *et al*,2001).

5.2.2 Diseño de SCARs para la detección e identificación de especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a café

Una vez se conocieron los patrones de bandeo por AFLP de los individuos recuperados del tejido vegetal de café en Colombia y los provenientes de África, se determinaron las bandas monomórficas exclusivas para una especie, es decir bandas que fueron comunes en una misma especie pero que al comparar con otras especies estuvieron ausentes. Este tipo de bandas se cortadaron del gel de acrilamida y se llevaron a un tubo eppendorf con Agua Mili Q estéril para hidratar el gel. Con ayuda de una punta de micropipeta se marceraró el gel hidratado para facilitar la salida del ADN del gel. A continuación se realizaró una amplificación de la banda por PCR agregando a un volumen de 20 µl de reacción de PCR, 12.7 µl del ADN eluído del gel de acrilamida, 1X de Buffer de PCR, 2.5mM $MgCl_2$, 40 ng de cada primer de AFLP que se usa en la amplificación preselectiva (E-0, M-0),

0.2mM dNTP's y 2.5U *Taq* Polimerasa. El programa de amplificación que se efectuó en el termociclador comprendió una denaturación inicial a 95℃ durante 5 min, 40 ciclos de una denaturación a 94℃ por 30 s, un anillamiento a 50℃ durante 60 s, una extensión a 72℃ por 90 s y una extensión final de 5 min a 72℃. La concentración de producto de PCR se evidenció en un gel de Agarosa 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio. Los marcadores fueron secuenciados en Macrogen (Korea) y la calidad de los cromatogramas resultantes se evaluada con el programa PHRED. A partir de estas secuencias se realizó un diseño de primers utilizando el programa Oligo Analyzer 3.0 (IDT Biotools) (http://scitools.idtdna.com/scitools/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx). Una vez los primers estuvieron sintetizados, se montaron amplificaciones de los marcadores usando organismos de las distintas especies de *Colletotrichum* para evaluar la capacidad de estos primers de diferenciar cada una de las especies de estos hongos. El producto de PCR se observó en una electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con Bromuro de Etidio.

5.2.3 Análisis de PCR en Tiempo Real para genotipificación de *Colletotrichum* spp. aislado de café

Para realizar pruebas de genotipificación por medio de PCR en Tiempo Real (qRT-PCR), se utilizó ADN de dos individuos por cada especie de *Colletotrichum* spp. de la población en estudio, usando los primers G10ScarF y G20ScarR. El fluorocromo y master mix usados en la prueba fue el SYBR Green I y el 2X qPCR master mix del DyNAmo™ SYBR Green 2-Step qRT-PCR Kit (FINNENZYMES) respectivamente. Para un volumen de reacción de 20 µl las condiciones usadas para la PCR fueron de 20ng de ADN, 1X qPCR master mix y 0.5mM de cada primer. El programa de amplificación se efectuó en un termociclador PTC-200 con un módulo o cabezote Chromo 4 (BIO RAD) basandose en una denaturación inicial de 94℃ por 11 min, 45 ciclos con una denaturación a 94℃ durante 1min; un anillamiento a 60.5℃ por

1min, extensión a 72℃ por 1min 30s, al finalizar la extensión en cada ciclo se realizó la lectura de fluorescencia del SYBR Green. La curva de Melting se efectuó con un rango de temperatura desde 60℃ hasta 95℃, realizando lecturas cada 0.2℃ y manteniendo la lectura 1 s.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Prueba de hidrólisis de caseína.

Buscando diferenciar las especies de manera más fácil, se sembraron 15 aislamientos en Agar CHM (Casein Hydrolysis Medium). Desde las 48 horas de incubación se logró diferenciar la capacidad del organismo para hidrolizar la caseína (Figura 5.1). La variabilidad intraespecífica en esta prueba bioquímica impidió obtener un patrón claro de diferenciación entre las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* (Anexo 3.2).

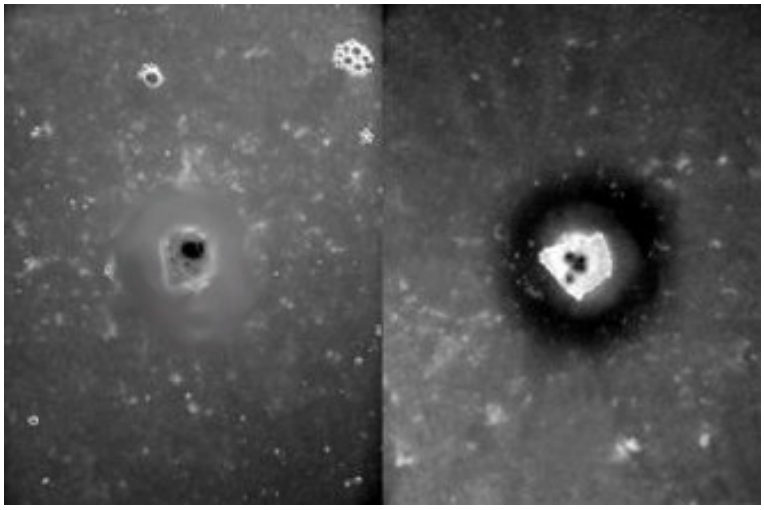


Figura 5.1 Prueba de Hidrólisis de Caseína en medio CHM (Casein Hydrolysis Medium) a las 48h de incubación. Izquierda= Negativo; derecha = Positivo.

5.3.2 Diseño de SCARs para la detección e identificación de especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a café.

Con las bandas polimorficas obtenidas en los geles de poliacrilamida (Figura 5.2), luego se tenerse la secuencia de cada uno de los marcadores, se diseñaron los primers G20ScarF (5' AAT GGC TCC AGC AAG GCA CGT ACC TAA 3') G20ScarR (5' TGA TGA GTC CTG AGT AAA CAG TCG T 3'), G10ScarF (5' TAT AAC GAG TCG CCA GAC TTC AAC 3'), G10ScarR (5' TGA CTG ACC AAT TCA CAC CAG CCA C 3').

A.

B.

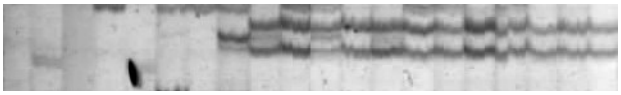


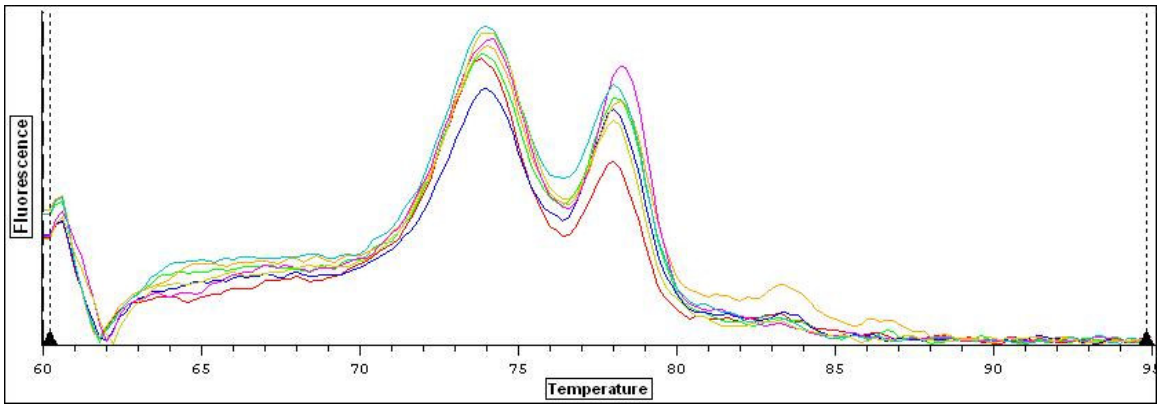
Figura 5.2 Ejemplos de marcadores AFLP aislados del gel de poliacrilamida para sintetizar SCARs. Bandas monomorficas exclusivas de *C. acutatum* (A), y de *C. gloeosporioides* (B).

5.3.3 Análisis de PCR en Tiempo Real para genotipificación de *Colletotrichum* aislado de café

Como otra alternativa de diagnóstico de *Colletotrichum* en café, se realizaron ensayos de genotipificación mediante la técnica de PCR en Tiempo Real, usando como colorante fluorescente el SYBRGreen I y los primers G10ScarF y G20ScarR . Las curvas de desnaturalizacion (*melting*) presentaron dos para todos los aislamientos picos con Tm de 74 y 78°C respectivamente (Figura 5.3), que fueron característicos de los aislamientos de *C. acutatum*,

C. kahawae Z1, *C. gloeosporioides* Collg05V y Collg38. Para los otros aislamientos de *C. gloeosporioides*, la curva presentó un tercer pico, Tm=84,5, haciendo posible la diferenciación de la especie de *C. gloeosporioides* de las otras dos asociadas a café. Sin embargo, los aislamientos que se caracterizaron previamente en los análisis de AFLP, ubicados como outgroups (Collg38) y cerca de *C. kahawae* (Collg05V), necesario el diseño de primers confirmatorios para este tipo de individuos.

A.



B.

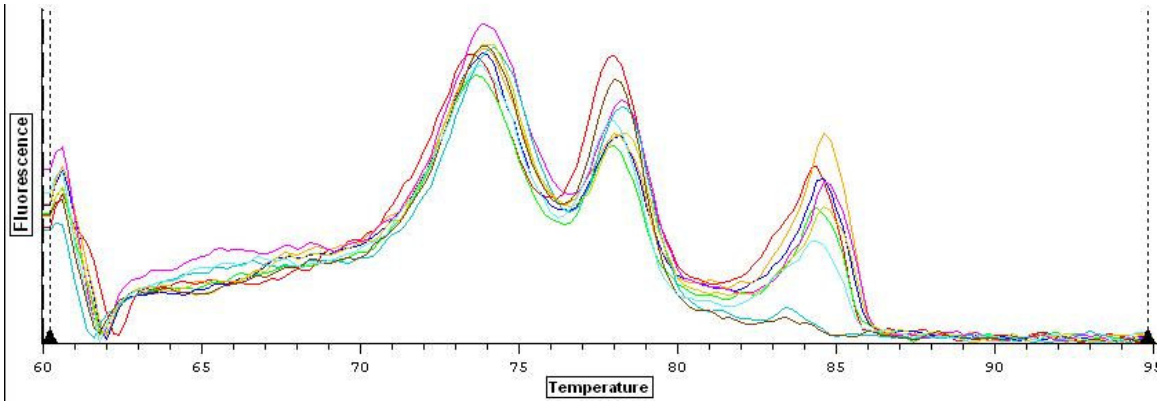


Figura 5.3 Comportamiento de la curva de melting para *C.acutatum* y *C. kahawae* (A), y *C.gloeosporioides* (B), representando 3 productos en la reacción de PCR con Tm de 74, 78 y 84,5°C, utilizando los primers G10ScarF y G20ScarR.

Teniendo en cuenta la distribución de las especies de la población en estudio a lo largo de los análisis moleculares tanto interespecíficos como intraespecíficos, su pueden lanzar dos hipótesis en cuanto al posible origen de las especies de *Colletotrichum* spp. asociado café.

La primera hipótesis sugiere que tanto *C. acutatum* como *C. gloeosporioides* pueden ser considerados como dos grupos monofiléticos, al haber evolucionado a partir de un ancestro común. Como se observa en la figura 5.4, el grupo de *C. gloeosporioides* es un grupo grande que incluye unos subgrupos de aislamientos que tienden más a parecerse entre si que con la totalidad del grupo aunque siguen perteneciendo a *C. gloeosporioides*. Al ser este grupo tan diverso en su interior o a nivel intraespecífico, mediante algunos cambios que llevaron muchos años, uno de los subgrupos constituyentes de *C. gloeosporioides* comenzó a presentar mas cambios, haciendo que este grupo comenzara a apartarse del gran grupo de *C. gloeosporoides*, entre estos posibles cambios se pudo dar un grado mayor de virulencia y adquirir la capacidad de poder causar enfermedad en frutos verdes de café, considerandose por muchos científicos como una especie aparte (i.e. *C. kahawae*), aunque como se ha expuesto a lo largo de la tesis, son epecies que tienen una gran problemática taxonómica.

La segunda hipótesis posible para explicar los resultados obtenidos en el trabajo, consiste en que esta vez el ancestro común para las especies de *C. kahawae* y *C. acutatum* es el amplio grupo de *C. gloeosporioides*, quien al igual que en la primera hipótesis enunciada, es un grupo formado por muchos subgrupos, y es un grupo ampliamente diverso. De una forma similar que en la primera hipótesis, cambios al interior del grupo de *C. gloeosporioides* provocó la diferenciación de la especie de *C. acutatum*, cambios que se dieron en un tiempo mayor o de una forma más acelerada que en *C. kahawae*, quien es una especie que aún es muy cercana a *C. gloeosporioides* sino que más virulenta.

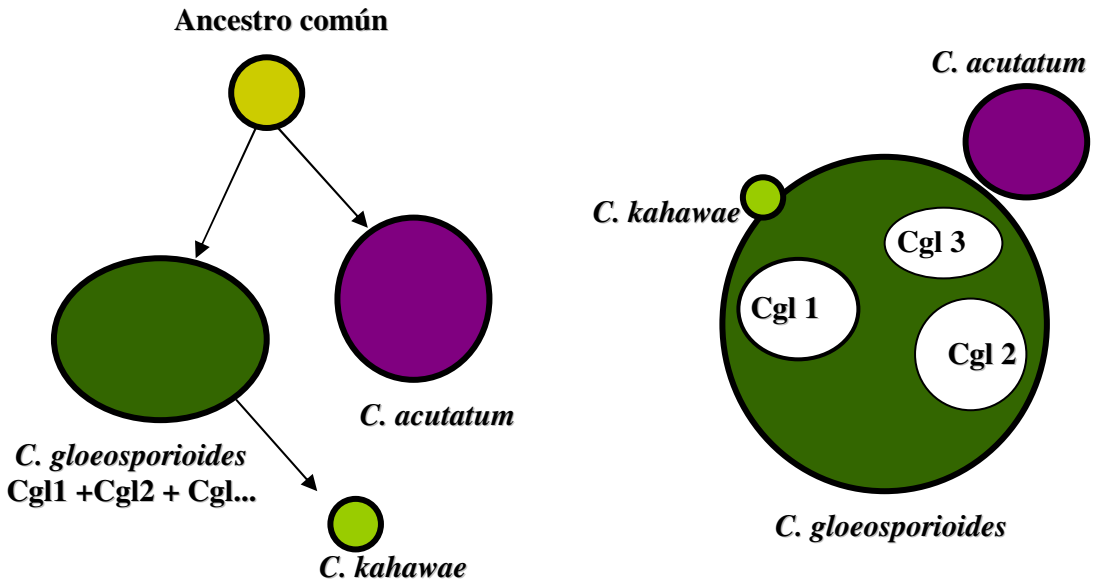


Figura 5.4 Hipótesis de surgimiento de las tres espcies de *Colletotrichum* asociadas a *Coffea arabica*.

5.4 REFERENCIAS

Bulat, S.A., Beck, M.L., Alekhina, I.A., Jensen, D.F., Knudsen, I.M.B. and Stephensen, P. 2000. Identification of a Universally Primed-PCR-Derived Sequence-Characterized Amplified Region Marker for an Antagonistic Strain of *Clonostachys rosea* and development of a Strain-Specific PCR Detection Assay. Applied and Environmental Microbiology. P. 4758-4763.

Eckstein, P.E., Krasichnska, N., Voth, D., Duncan, S., Rossnagel, B.G. and Scoles, G.J. 2001. Development of PCR-based makers for a gene (Un8) comferring true loose smut resistance in barley. Canadian Journal of Plant Pathology. Vol 24. P. 46-53.

Estrada, A.B., Dodd, J.C., and P. Jeffries. 2000 Effect of humity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant pathology 49: 605 - 618.

Martin, M.P., and Garcia- Figueres, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. European Journal of Plant Pathology 105: 733 – 741.

Waller, J.M., Bridge, P.D., Black, and R., Hakiza, G. 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. Mycological research 97 : 989 - 994

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. A partir de los estudios realizados en este trabajo se logró determinar la variabilidad genética de las especies de *Colletotrichum* encontrados en café en la zona central cafetera colombiana e identificarlos como *C. acutatum* y *C.gloeosporioides*; aislamientos que harán parte de la colección de referencia de este género en CENICAFÉ.

2. De los genes evaluados en la caracterización interespecífica de *Colletotrichum* (ITS y β- tubulina), se observó que el gen que aportó mayor información en el momento de construir los dendrogramas fue el de β- tubulina, debido tanto a la longitud de su amplicón como a la actividad biológica (proteína) y por lo tanto la capacidad de cambio es mas limitada que en los ITS.

3. Tanto en el análisis de caracterización interespecífica e intraespecífica se observó la presencia de dos grupos principales; uno conformado por las especies de *C. acutatum* y otro formado por la especie *C. gloeosporioides* dentro del cual se encontraron las especies de *C. kahawae*, procedentes de aislamientos africanos. Sin embargo, la información de los análisis intraespecíficos permitieron una mejor clasificación de la población estudiada.

4. Por medio del uso de la técnica de RAPDs, se logró una clasificación inicial de la población y demostrar la diversidad de esta para así poder

realizar trabajos con AFLP que permitieron tener una clasificación más profunda.

5. El dendrograma obtenido a partir de marcadores AFLPs evidenció la presencia de dos grupos formados por *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* dentro del cual se encontró el grupo de *C. kahawae.* Aunque el aislamiento africano Mal1 está identificado como *C. gloeosporioides* se encuentra lejano del gran grupo de *C. gloeosporioides* colombianos. Este dendrograma también permitió evidenciar la cercanía de algunos aislamientos colombianos como Collg05V a *C. kahawae*, demostrando la gran problemática taxonómica que se ha tenido durante varios años en cuanto a la separación de estas dos especies y aún al diagnóstico de cada una de estas.

6. A pesar de que el método de diagnóstico bioquímico por Hidrólisis de Caseína es una herramienta fácil de usar, no mostró ser una técnica confiable, ya que a raíz de la variabilidad intraespecífica no se pudo obtener un patrón claro de diferenciación entre las especies de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides.*

7. Con el diseño de SCARs para la detección e identificación de especies de *Colletotrichum* asociados a café se evidenciaron diferencias marcadas de *C. gloeosporioides* con los primers G10ScarF y G20ScarR por la presencia de tres picos en la curva meeting, que oscilan entre temperaturas de 70-86℃ comparado con *C. acutatum* y *C. kahawae* quienes presentaron solo 2 productos de PCR, dando una posibilidad de identificar por medio de dicha técnica, la especie de *C. gloeosporioides*. Sin embargo, en esta técnica dos aislamientos de *C. gloeosporioides* tuvieron un comportamiento

similar al de *C. kahawae*, es de destacar que dichos aislamientos son los que se encuentran mas alejados del grupo principal en el dendrograma realizado a partir de marcadores AFLPs.

8. Aunque el diseño de SCARs es un método de diagnóstico confiable, en este estudio se evidenció que no se puede aplicar como una única herramienta para la identificación de las especies de *Colletotrichum* al cultivo del café, lo que hace necesario el diseño de primers más específicos para especies de este género.

RECOMENDACIONES

1. Con el fin de conocer el comportamiento patogénico de cada uno de los aislamientos evaluados, se recomienda realizar pruebas de patogenicidad *Coffea arabica*.

2. Diseñar juegos de primers que permitan mejorar los resultados de amplificación diferencial que se obtuvieron en este trabajo usando la técnica de qRT-PCR.

ANEXOS

1.1 Enfermedades del cafeto en el mundo

ENFERMEDAD	HONGO CAUSANTE
Antracnosis	*Glomerella cingulata*
Pudrición radical de armilaria	*Armillaria mellea*
Enfermedad de Bar	*Fusarium stilboides*
Mancha del Fruto o Mancha de hierro	*Cercospora coffeicola*
Llaga negra o pudrición negra de la raíz	*Rosellinia bunodes*
Llaga estrellada de la raíz	*Rosellinia pepo*
Damping off o Volcamiento	*Rhizoctonia solani*
Añublo pardo	*Colletotrichum gloeosporioides*
Mancha foliar café o muerte descendente	*Phoma sp.*
Chancro o llaga macana	*Ceratocystis fimbriata*
Chancro	*Phomopsis coffeae*
Collar spot	*Fusarium stilboides*
CBD o enfermedad de las cerezas	*Colletotrichum kahawae*
Die-back o muerte descendente	*Ascochyta tarda*
Pudrición seca de la raíz	*Fusarium solani*
Añublo foliar	*Ascochyta tarda*
Mancha foliar	*Phyllosticta coffeicola*
Mal rosado	*Corticium salmonicolor*
Ampollamiento rojo (Robusta)	*Cercospora coffeicola*
Pudrición roja de la raíz	*Ganoderma philippi*
Roya anaranjada	*Hemileia vastatrix*
Roya polvosa o polvorienta	*Hemileia coffeicola*
Mancha foliar suramericana	*Mycena citricolor*
Arañera	*Corticium koleroga*
Quemazón de la punta	*Phoma sp. Phoma constarricencis*
Traqueomicosis	*Gibberella xylarioides*
Cereza verrugosa	*Botrytis cinerea var. Coffeae*

Fuente: Gaitan, 2003.

1.2 Características morfológicas y patogénicas de especies de *Colletotrichum* comúnmente asociadas a café.

Genero: Colletotrichum	Características de la colonia	Conidios	Características metabólicas	Patogenicidad
Colletotrichum kahawae	• Crecimiento lento 2-4 mm/d. • Micelio grisoso a verde oliva de claro a oscuro. • No forma acérvulos. • Conidios a partir de las hifas.	Conidios rectos, cilindricos sin septos 12.5–19.0 x4.0 µm nacen en conidióforos aéreos nunca en acervulos,	No puede utilizar citrato ni tartrato como única fuente de carbono.	Produce antracnosis en frutos verdes e hipocótilos de *Coffea arabica,* Específicamente el CBD
Colletotrichum gloeosporioides	• Crecimiento rápido 3-6 mm/d. • Micelio blanco a gris pálido. • Forma acérvulos y conidios a partir de éstos o simples hifas. • Ocasionalmente produce setas	Conidios cilindricos de tamaño variable 12.8 x 3.7 µm, Crecen en hifas y acervulos conidios unicelulares	Puede utilizar citrato o tartrato o ambos como fuente de carbono Proteasa negativo en medio de hidrólisis de caseina	No es patogénico a frutos verdes ni hipocótilos de *Coffea arabica.* (Waller *et al*, 1993)
Colletotrichum acutatum	• Crecimiento lento. • Micelio aéreo profuso, de color rosado. Puede producir setas	Conidios rectos, fusiformes puntiagudos 12.1 x 3.4 µm. Crece en hifas y acervulos	Proteasa positivo en medio de hidrólisis de caseina (García, et al, 1999)	Por determinar
Glomerella cingulata	• Micelio estéril blanco • No produce conidios. • Peritecio se produce después de 2 semanas	Forma ascas claviformes de 55 a 130 x 8–18 µm˜ Ascosporas hialinas de 15–20x3.5 a 5 µm	Por determinar	Por determinar

3.1 Protocolo de extracción directa de ADN según Goodwin & Lee, 1993

1. Seleccionar colonias puras crecidas sobre una placa de Agar y realizar un raspado del micelio y de la costra superficial que este forma sobre el agar.
2. Depositar éste en un tubo eppendorf de 2 ml.
3. Adicionar 400 ul de Buffer de lisis y macerar con un macerador eléctrico.
4. Una vez el micelio está totalmente macerado, destapar el tubo eppendorf e introducirlo a un horno microondas al nivel máximo de poder durante 20 seg, luego 15 seg y por último 10 seg, teniendo cuidado de que no se rebose el producto del anterior paso por ebullición.
5. Al contenido del tubo adicionar 300 ul más de Buffer de lisis, hacer vortex e incubar en un baño de agua caliente a 80℃/ 10 min.
6. Una vez los tubos se han enfriado a una temperatura de 50℃, agregar 10ul de Proteinasa K (0.5 mg/ml), agitar bien, hacer vortex y luego incubar a 50℃/30 min.
7. Agregar al tubo 700 ul de Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol 25:24:1, mezclar suavemente y centrifuagar a 10000 rpm/10min.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 20 ml y agregar el mismo volumen de cloroformo:isoamilalcohol (24:1). Mezclar suavemente y centrifugar a 10000 rpm/10min.
9. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml y agregar 2 volumenes de isopropanol frío. Dejar precipitar 2 horas a –20℃ o toda la noche.
10. El pellet resultante se obtiene de centrifugando los tubos a 10000rpm/5 min. Descartar el sobrenadante.
11. Los pellets se la lavan con etanol 70° (500ul) y se centrifuga a 10000 rpm/ 2 min, se descarta el sobrenadante.
12. Secar el pellet a temperatura ambiente por 1 hora.
13. Resuspender en 50 ul de Buffer EB. Adicionar RNAsa e incubar a 37℃/ 30 min.

14. Visualizar la calidad del DNA en un gel de Agarosa 1% teñido con Bromuro de Etidio.

- **Buffer de Lisis**

50mM Tris HCl pH 7.2
50mM EDTA pH 8.0
3% SDS
1% Mercaptoetanol

Nota: Preparar en cámara de extracción y envolver el frasco en papel aluminio o preparar en frasco color ámbar.

Anexo 3.2 Origen de los aislamientos caracterizados de *Colletotrichum* asociados a café, secuencia homologa con el GenBank y su correspondiente respuesta a hidrólisis de caseína (Nd = No determinado)

Individuo	Blastn ITS	Lugar Procedencia	Organo Planta	Caseína	Blastn B-tub
ColH01	*C.acutatum*	La Plata, Huila	Hoja	+	*C. acutatum*
ColH02	*C.acutatum*	La Plata, Huila	Hoja	+	*C. acutatum*
ColH03	*C.acutatum*	La Plata, Huila	Hoja	Nd	*C. acutatum*
ColH04	*C.acutatum*	La Plata, Huila	Hoja	+	*C. acutatum*
ColH05	*C.acutatum*	La Plata, Huila	Hoja	-	*C. acutatum*
ColH06	*C.acutatum*	La Plata, Huila	Hoja	Nd	*C. acutatum*
ColH07	*C.acutatum*	La Plata, Huila	Hoja	-	*C. acutatum*
ColH08	*C.acutatum*	La Plata, Huila	Hoja	+	*C. acutatum*
Collg03	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	Nd	*C.gloeosporioides*
Collg04	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	+	*C.gloeosporioides*
Collg05V	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	-	*C.gloeosporioides*
Collg07	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	Nd	*C.gloeosporioides*
Collg10	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	Nd	*C.gloeosporioides*
Collg11	*C.acutatum*	Chinchiná,Caldas	Fruto	+	*C. acutatum*
Collg14	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	-	*C.gloeosporioides*
Collg19	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	Nd	*C.gloeosporioides*
Collg24	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	-	*C.gloeosporioides*
Collg31	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Hoja	+	*C.gloeosporioides*
Collg45	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	Nd	*C.gloeosporioides*
Collg46	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	+	*C.gloeosporioides*
Collg48	*C.gloeosporioides*	Chinchiná,Caldas	Fruto	-	*C.gloeosporioides*
Col Z1	*C. kahawae*	Zimbabwe, África	Nd	Nd	*C. kahawae*
Col Z9	Nd	Zimbabwe, África	Nd	Nd	Nd
Col Q2	*C. kahawae*	Kenia, África	Nd	Nd	*C. kahawae*
Col Ca1	*C. kahawae*	Camerún, África	Nd	Nd	*C. kahawae*
Col Mal1	Nd	Malawi, África	Nd	Nd	Nd

Anexo 5.1 Agar de Hidrólisis de Caseína

KH_2PO_4	1.0g
KCl	0.5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1g
15% Leche Descremada	25.0ml
Glucosa	10.0g
Agar	12.0g
Agua Destilada	1000ml

La leche descremada 15% se hace al disolver 3.75 g de leche descremada en polvo en 25ml de agua destillada. Ajustar el medio a pH 5.4 y esterilizar autoclavando a 5psi por 30 min.