



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Identificación y caracterización de especies de *Colletotrichum* spp., causantes de antracnosis en frutos de aguacate *Persea americana* var. Hass.**

**Gloria Magali Cobo Núñez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agrícolas  
Sede Palmira, Colombia  
2017



# **Identificación y caracterización de especies de *Colletotrichum* spp., causantes de antracnosis en frutos de aguacate *Persea americana* var.Hass.**

**Gloria Magali Cobo Núñez**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Agrarias**

Director:  
Ph.D., Carlos Germán Muñoz Perea

Co-director:  
Ph. D., Mario Augusto Garcia Dávila

Línea de Investigación:  
Protección de Cultivos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agrícolas  
Sede Palmira, Colombia  
2017



## **Dedicatoria**

- *A **DIOS**, por estar siempre ahí, en todo momento y lugar, dándome la oportunidad de soñar y poder realizar mis metas.*
- *A mi gran amor mi **Esposo ALBERTO FIGUEROA VALDERRAMA**, por creer en mí y por siempre brindarme su apoyo incondicional. A su gran sacrificio y a toda una vida compartida. ¡Este logro es para ti!*
- *A **mis hijos CRISTIAN ALBERTO y LINDA YULIANA**, por comprender, apoyarme y esperar siempre de mí.*
- *Al mejor **papá JESÚS MARÍA COBO CAMPO** ... que Dios lo tenga en su Gloria!. Por todos sus sabios consejos y apoyos incondicionales, hoy y siempre lo llevaré en mi memoria.*
- *A **mamá MAURA NUÑEZ DE COBO**, por su comprensión y apoyo, brindándome siempre su mano.*
- *A mi Profe **CARLOS ALBERTO HUERTAS DAVEY**, por todas sus enseñanzas, amistad y apoyo, siempre lo llevaré en mi corazón!*
- *A mi profe **CARLOS GERMÁN MUÑOZ PEREA**, por la dirección en la realización de esta investigación, creer en mí y por siempre apoyarme.*
- *Al Profesor Titular **MARIO AUGUSTO GARCÍA DÁVILA**, por su apoyo incondicional y valioso en la realización de esta investigación. Mil gracias.*



## Agradecimientos

**Universidad Nacional de Colombia**, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Sede Palmira, por la oportunidad y su valioso apoyo.

**Carlos Germán Muñoz Perea**. Profesor Asociado, Director de tesis. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira., por su orientación.

**Mario Augusto García Dávila**. Profesor Titular, Director de tesis. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, por su apoyo, acompañamiento y orientación en análisis estadísticos.

**Jaime Eduardo Muñoz**. Profesor Titular, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Laboratorio de Biología Molecular, por su apoyo, orientación y disponibilidad en el préstamo de los equipos y materiales necesarios para el desarrollo de la caracterización molecular de esta investigación.

**Duban Fernando Mosquera Palta**, Estudiante de Ingeniería Agronómica, por su apoyo en la caracterización morfológica de cada uno de los aislamientos encontrados.

**Cristian Domínguez Pulgarín**, Estudiante de Ingeniería Agronómica, por su apoyo en las pruebas de patogenicidad y control *in vitro* de cada uno de los aislamientos encontrados.

**Camila Andrea Hernández Varela**, Estudiante de Ingeniería Agronómica, por su gran apoyo en la caracterización molecular de cada una de los aislamientos encontrados.

**Jorge Mario Londoño**, Biólogo. Estudiante de maestría en Ciencias Biológicas, Línea de investigación en Biotecnología. Por su apoyo y orientación en la caracterización molecular de esta investigación. Mil gracias.

**Propietarios y cultivadores de aguacate Hass de los predios visitados**, en las diferentes fincas y municipios del Valle del Cauca. Mil gracias por su comprensión, buen entendimiento y aportes, en la toma de muestras.

**Eyder Daniel Gómez López**. Profesor Asociado. Laboratorio de Sanidad Vegetal. Universidad Nacional, Sede Palmira, por la oportunidad brindada en el inicio de este trabajo. Mil gracias por sus valiosos aportes.

**Carlos Alberto Huertas Davey**, M.Sc., Candidato a Ph.D., por todas las enseñanzas impartidas.

**Alexandra García Torres**. I.A., Laboratorio Sanidad y Microbiología Agrícola, por su apoyo y oportunos consejos.



## Resumen

La principal limitante de la producción de aguacate *Persea americana* Mill var. Hass en Colombia es la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp., sin embargo, se desconoce su variabilidad inter e intraespecífica. Nuestro objetivo consistió en caracterizar morfológica y molecularmente los diferentes aislamientos de *Colletotrichum* spp., obtenidos de frutos de aguacate var. Hass en 14 municipios del Valle del Cauca. Además de evaluar la patogenicidad y control *in vitro* de cada uno de los aislamientos encontrados Se aislaron 59 cepas monoconidiales de las cuales se evaluó la velocidad de crecimiento radial, se realizó un análisis detallado del tipo, longitud y área de las conidias de cada uno los aislamientos, con el programa Image J. Además, se evaluaron variables morfológicas como la formación y distribución de las estructuras de resistencia y el color de los aislamientos. Se realizó un DCA con 59 tratamientos y 50 repeticiones, se analizó con el programa estadístico (SAS Deployment Wizard 9.4). Algunos aislamientos, formaron estructuras de resistencia como acérvulos y peritecios, después de los diez días de incubación. Se observó que si hay diferencia significativa para la velocidad de crecimiento radial en los aislamientos. El promedio de crecimiento radial total fue 35,4 mm/10 días., el  $R^2$  indicó que el experimento se ajusta un 72%. Se encontraron formas de las conidias oblongas en un 44%, fusiforme en un 35% arriñonada 19% y elíptica 2%. Se observó que si hay diferencia significativa para la variable área de conidias. El promedio total fue 73,49  $\mu\text{m}^2$  de largo. Los resultados muestran una alta diversidad entre aislamientos provenientes de los diferentes sitios de producción y se presentan al menos tres especies de *Colletotrichum* spp.

Debido a la importancia de la enfermedad en aguacate var. Hass, causada por el hongo *Colletotrichum* spp., se realizaron los análisis moleculares de los 59 aislamientos monospóricos obtenidos, donde se realizó la extracción de ADN y amplificación mediante PCR, utilizando los primers ITS1 e ITS4 para identificación de la secuencia ribosomal interna, y para secuencias parciales con los primers actina (ACT), Chitin

syntetase 1 (CHS), Glyceraldehyde-3-fosphate dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ - tubulin 2 (TUB) Calmodulin (CAL), CgInt, y Calnt2. Los resultados muestran que el 45,8% amplifican positivo para *Colletotrichum gloeosporioides* y el 23,7% para *Colletotrichum acutatum* con un peso molecular aproximado de 490bp y 500bp respectivamente. Para las demás secuencias de genes se observa que 28 aislamientos amplifican para ACT, 54 para CHS, 52 para GD, 25 para TUB y 11 para CAL, estos resultados indican la amplia diversidad registrada de especies y razas del patógeno en el Valle del Cauca, la cual se determinó mediante secuenciación de ADN para algunos aislamientos.

Para la exportación de aguacate var. Hass en Colombia se deben cumplir requisitos de orden fitosanitario, por lo que se evaluó la patogenicidad y la efectividad *in vitro* de fungicidas de síntesis química para 59 aislamientos monoconidiales de *Colletotrichum* spp., asociados a antracnosis en frutos de aguacate var. Hass. Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron frutos con madurez fisiológica, los cuales se inocularon con aislamientos de 8 dds, a una concentración de  $10^6$  conidias/ml y se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Para las pruebas de susceptibilidad/resistencia al control químico, se evaluaron 6 fungicidas: *Tebuconazole* + *Prochloraz*; *Azoxystrobin* + *Tebuconazole*; *Prochloraz*; *Sulfato de cobre pentahidratado*; *Myclobutanil*; y *Azoxystrobin* + *Flutriafol* y un testigo; determinando de manera visual los cambios microscópicos de las estructuras somáticas y reproductivas. Seis aislamientos de los 59 se destacaron por su alta patogenicidad y 8 con resistencia a fungicidas. Hubo diferencias significativas en la efectividad media de los fungicidas: *Prochloraz* 99.7%; y *Tebuconazole* + *Prochloraz* 99.2%; *Azoxystrobin* + *Tebuconazole* 85.5%; *Azoxystrobin* + *Flutriafol* 56.5%; *Myclobutanil* 18.3% y *Sulfato de Cobre Pentahidratado* 9.8%. Los efectos estructurales de los fungicidas en los aislamientos escogidos al azar, consistieron en deformaciones acompañadas de engrosamiento del micelio. Se discute las implicaciones de los resultados en el manejo de la enfermedad.

**Palabras clave:** Aguacate, *Colletotrichum*, Hass, morfología, caracterización, PCR, molecular, patogenicidad, fungicidas.

## Abstract

The main limitation of the production of avocado *Persea americana* Mill var. Hass in Colombia is the anthracnose caused by *Colletotrichum* spp., However, its inter- and intraspecific variability is unknown. Our objective was to characterize morphologically and molecularly the different isolates of *Colletotrichum* spp., obtained from fruits avocado var. Hass in 14 municipalities of Valle del Cauca. In addition to evaluating the pathogenicity and *in vitro* control of each of the isolates found, 59 monoconidial strains of which the radial growth rate was evaluated, a detailed analysis of the type, length and area of the conidia of each one Isolates, with Image J. In addition, we evaluated morphological variables such as the formation and distribution of resistance structures and the color of the isolates. We performed a DCA with 59 treatments and 50 replicates, which was analyzed using the statistical software (SAS Deployment Wizard 9.4). Some isolates, formed structures of resistance like acérvulos and perithecios, after the ten days of incubation. It was observed that if there is significant difference for the radial growth rate in the isolates. The average total radial growth was 35.4 mm / 10 days, the R2 indicated that the experiment adjusted 72%. Forms of oblong conidia were found in 44%, fusiform in 35% hailed 19% and elliptical 2%. It was observed that if there is significant difference for the conidia area variable. The total average was 73.49  $\mu\text{m}^2$  in length. The results show a high diversity between isolates from different production sites and at least three species of *Colletotrichum* spp.

Due to the importance of the disease in avocado var. Hass, caused by the fungus *Colletotrichum* spp., The molecular analyzes of the 59 monosporic isolates obtained were performed, where DNA extraction and PCR amplification were performed using the ITS1 and ITS4 primers to identify the internal ribosomal sequence and (ACT), Chitin syntetase 1 (CHS), Glyceraldehyde-3-fosphate dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ -tubulin 2 (TUB) Calmodulin (CAL), CgInt, and Calnt2. The results show that 45.8% amplify positive for *Colletotrichum gloeosporioides* and 23.7% for *Colletotrichum acutatum* with an approximate molecular weight of 490bp and 500bp respectively. For the other gene sequences it is observed that 28 isolates amplify for ACT, 54 for CHS, 52 for GD, 25 for TUB and 11 for CAL, these results indicate the wide diversity of species and races of the pathogen in Valle del Cauca, which was determined by DNA sequencing. For some isolates.

For the export of avocado var. Hass in Colombia, phytosanitary requirements must be met, and the pathogenicity and *in vitro* effectiveness of chemical synthesis fungicides were evaluated for 59 monoconidial isolates of *Colletotrichum* spp., Associated with anthracnose in avocado var Hass fruits. For the pathogenicity tests, fruits with physiological maturity were used, which were inoculated with isolates of 8 dds, at a concentration of 10<sup>6</sup> conidia / ml and a completely randomized design (DCA) was used. For the susceptibility / resistance tests to chemical control, 6 fungicides were evaluated: Tebuconazole + Prochloraz; Azoxystrobin + Tebuconazole; Prochloraz; Copper sulphate pentahydrate; Myclobutanil; And Azoxystrobin + Flutriafol and a control; Visually determining microscopic changes in somatic and reproductive structures. Six isolates of the 59 were distinguished by their high pathogenicity and 8 with resistance to fungicides. There were significant differences in the average effectiveness of the fungicides: Prochloraz 99.7%; And Tebuconazole + Prochloraz 99.2%; Azoxystrobin + Tebuconazole 85.5%; Azoxystrobin + Flutriafol 56.5%; Myclobutanil 18.3% and Copper Sulphate Pentahydrate 9.8%. The structural effects of fungicides on randomly selected isolates consisted of deformations accompanied by thickening of the mycelium. The implications of the results in the management of the disease are discussed.

**Keywords:** Avocado, *Colletotrichum*, Hass, morphology, characterization, PCR, molecular, pathogenicity, fungicides.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Revisión de Literatura</b> .....	<b>7</b>
1.1    Importancia del aguacate <i>Persea americana</i> var. Hass.....	7
1.2    Origen del aguacate .....	8
1.3    Importancia económica .....	8
1.4    Antracnosis .....	12
1.5    Agente causal .....	12
1.6    Infección de <i>Colletotrichum</i> spp .....	13
1.7    Sintomatología .....	14
1.7.1.  Rango de hospederos .....	15
1.8    Clasificación taxonómica.....	16
1.9    Características del género <i>Colletotrichum</i> .....	17
1.9.1 <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	18
1.9.2 <i>Colletotrichum boninense</i> .....	19
1.9.3 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	19
1.10 <i>Colletotrichum</i> spp., en aguacate .....	20
1.11   El aguacate variedad Hass, importancia para el sector agrícola de Colombia.....	21
1.12   Caracterización molecular .....	22
1.12.1  Región espaciadora interna (ITS).....	25
1.12.2  Análisis multilocus.....	26
1.12.3  Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
1.12.4  Herramientas bioinformáticas.....	27
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	<b>28</b>
2.1    Localización de estudio.....	28
2.2    Colección de Aislamientos del Patógeno <i>Colletotrichum</i> spp .....	34
2.2.1  Recolección de muestras .....	34
2.2.2  Aislamiento del patógeno .....	34
2.2.3  Cultivos monospóricos .....	37
2.3    Caracterización Morfológica.....	39
2.3.1  Características morfológicas y de crecimiento .....	39
2.4    Caracterización Molecular .....	41

2.4.1	Extracción de ADN .....	43
2.4.2	Electroforesis .....	44
2.4.3	Cuantificación de ADN.....	44
2.4.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	44
2.4.5	Secuenciación .....	47
2.4.6	Análisis bioinformáticos .....	47
2.5	Pruebas de Patogenicidad .....	48
2.5.1	Recolección del material vegetal para pruebas de patogenicidad .....	49
2.5.2	Desinfección de material vegetal .....	49
2.5.3	Preparación del inóculo .....	50
2.5.4	Diseño experimental .....	50
2.5.5	Inoculación del patógeno .....	51
2.5.6	Evaluación de la infección .....	52
2.5.7	Reaislamiento del patógeno.....	52
2.6	Evaluación <i>in vitro</i> de fungicidas para el control de <i>Colletotrichum</i> spp .....	53
2.6.1	Productos utilizados.....	53
2.6.2	Preparación de fungicidas en agar PDA. ....	54
2.6.3	Siembra de aislamientos en medio de cultivo con fungicida.....	56
2.6.4	Evaluación de la inhibición micelial. ....	56
2.6.5	Diseño experimental de evaluación del control. ....	57
2.6.6	Evaluación estructural del efecto de los fungicidas. ....	57
2.6.7	Pruebas de sensibilidad a moléculas de síntesis química .....	57
<b>3.</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>59</b>
3.1	Elaboración del cepario: codificación, aislamiento y conservación de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	59
3.1.1	Cultivos monospóricos.....	59
3.2	Caracterización morfológica de <i>Colletotrichum</i> spp en aguacate <i>Persea americana</i> var. Hass .....	61
3.2.1	Aislamientos. ....	61
3.2.2	Clasificación de colonias.....	61
3.2.3	Crecimiento de colonias.....	64
3.2.4	Registros fotográficos .....	74
3.2.5	Análisis de micrografías.....	74
3.2.6	Morfología de las conidias .....	74
3.2.7	Tamaño de las conidias, .....	76
3.3	Caracterización Molecular .....	81
3.3.1	Extracción de ADN .....	81
3.3.2	Proceso de Identificación de los complejos de <i>Colletotrichum</i> spp con primers específicos. ....	81
3.3.3	Proceso de Identificación de los complejos de <i>Colletotrichum</i> spp con Primers complementarios .....	84
3.4	Caracterización molecular .....	88
3.4.1	Análisis de máxima parsimonia para la región GD.....	90
3.4.2	Análisis de máxima parsimonia para la región CAL .....	93
3.4.3	Análisis de máxima parsimonia para la región Calnt2.....	95
3.4.4	Análisis de máxima parsimonia para la región CgInt.....	97
3.4.5	Análisis de máxima parsimonia para la región CHS.....	99
3.4.5.	Análisis de máxima parsimonia para la región ACT .....	101

---

3.4.6	Análisis de máxima parsimonia para las regiones consenso ACT-CHS-GD	103
3.4.7	Análisis de máxima parsimonia para las regiones consenso TUB.....	105
3.5	Patogenicidad de <i>Colletotrichum</i> spp.....	107
3.6	Control <i>in-vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp .....	115
3.6.1	Efectos estructurales de los fungicidas sobre los aislamientos.....	122
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>133</b>
4.1	Conclusiones .....	133
4.2	Recomendaciones .....	134
<b>5.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>151</b>

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. El aguacate en el mundo .....	9
Figura 2. Principales núcleos productores de aguacate Hass en Colombia .....	11
Figura 3. Municipios del departamento del Valle del Cauca, donde se realizaron los muestreos. ....	32
<b>Figura 4. Visita a fincas con cultivos de Aguacate var. Hass en el Valle del Cauca. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 5: Muestras colectadas en incubación a la aparición de los síntomas.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 6: Daños por antracnosis .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 7: Métodos de conservación de cultivos monospóricos.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 8. Crecimiento y recolección de micelio de <i>Colletotrichum</i> spp en medio líquido y sólido, para extracción de ADN.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 9: Procesamiento e inoculación de frutos.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 10: Siembra de aislamientos en medio tratado con fungicida .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 11: Características macro observadas en los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. ....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 12 . Distribución categorías de crecimiento de <i>Colletotrichum</i> spp .....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 13. Estructuras observadas en los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 14. Distribución de de los aislamientos según el Crecimiento radial (mm) de <i>Colletotrichum</i> spp <i>in vitro</i> a los diez (10) días después de incubación (ddi). ....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 15. Largo de conidias de <i>Colletotrichum</i> spp, <i>in vitro</i> a los diez (10) días después de incubación (ddi).....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 16. Ancho de conidias de <i>Colletotrichum</i> spp, <i>in vitro</i> a los diez (10) días después de incubación (ddi).....</b>	<b>71</b>
<b>Fuente: G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M. García D., 2016</b> Figura 17. Area de conidias $\mu\text{m}$ <i>in vitro</i> a los diez (10) días después de incubación (ddi).....	<b>73</b>
<b>Figura 18. Distribución de formas de conidias de <i>Colletotrichum</i> spp. ....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 19: Morfología de conidias observada en los 59 aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 20. Características morfológicas de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp, .....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 21: Electroforesis de muestras positivas de <i>Colletotrichum</i> spp., producto de PCR para el Primer CgInt.....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 22. Geles de agarosa, que visualizan el amplificado de los aislamientos identificados como <i>Colletotrichum acutatum</i>, con un fragmento de 490 pb. ....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 23: Electroforesis GD final muestras positivas a 59,6°C a 30" .....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 24: Electroforesis CAL Final, 54,1 ° C 30" .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 25: Electroforesis TUB final 55°C a 30" .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 26. ACT Muestras positivas 59oC, 30", .....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 27. CHS muestras positivas 58°C a 30" .....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 28.: Màxima parsimonia para la región GD .....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 29: Màxima Parsomonia para la región CAL.....</b>	<b>94</b>

<b>Figura 30.: Mxima Parsimonia para la regi3n Calnt2.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 31. Mxima Parsimonia para la regi3n CgInt.....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 32.: Mxima parsimonia para la regi3n CHS.....</b>	<b>100</b>
Figura 33. Mxima parsimonia para la regi3n ACT.....	102
<b>Figura 34: Consenso de las regiones ACT_CHS_GD .....</b>	<b>104</b>
<b>Figura 35: Mxima parsimonia TUB .....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 36. Frutos con infecciones efectivas y síntomas de infecciones no efectivas.....</b>	<b>107</b>
<b>Figura 37. Tabla de color para categorizaci3n de estados de maduraci3n propuesta.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 38. Tipos de síntomas internos a los 7ddi, corte longitudinal de frutos inoculados.....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 39. Signos superficiales de la enfermedad expresados a los 7 ddi.....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 40. Grados de patogenicidad de los aislamientos.....</b>	<b>114</b>
<b>Figura 41: Control <i>in vitro</i> Prochloraz + Tebuconazole .....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 42: Control <i>in vitro</i> con Azoxystrobin + Tebuconazole.....</b>	<b>117</b>
<b>Figura 43: Control <i>in vitro</i> Flutriafol + Azoxystrobin.....</b>	<b>117</b>
<b>Figura 44: Control <i>in vitro</i> Prochloraz .....</b>	<b>118</b>
<b>Figura 45: Control <i>in vitro</i> con Myclobutanil.....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 46: Control <i>in vitro</i> con Sulfato de Cobre Pentahidratado .....</b>	<b>120</b>
<b>Figura 47. Agrupaci3n Duncan para aislamientos según la variable %IM medio.....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 48. Agrupaci3n Duncan para productos según valor medio de la variable % IM medio.....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 49. Respuesta morfol3gica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp al producto Azoxystrobin + Tebuconazole.....</b>	<b>125</b>
<b>Figura 50: Respuesta morfol3gica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp al producto Tebuconazole + Prochloraz.....</b>	<b>126</b>
<b>Figura 51. Respuesta morfol3gica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp al producto Azoxystrobin + Flutriafol .....</b>	<b>127</b>
<b>Figura 52. Respuesta morfol3gica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp al producto Prochloraz.....</b>	<b>128</b>
<b>Figura 53. Respuesta morfol3gica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp al producto Myclobutanil....</b>	<b>129</b>
<b>Figura 54. Respuesta morfol3gica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp al producto Sulfato de cobre pentahidratado.....</b>	<b>130</b>
<b>Figura 55. Respuesta morfol3gica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp Testigo en PDA .....</b>	<b>131</b>

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Principales núcleos productores de aguacate Hass en Colombia.....	11
Tabla 2: Recolección de muestras de frutos de aguacate <i>Persea americana</i> var. Hass afectados por antracnosis <i>Colletotrichum</i> spp., en el Valle del Cauca. ....	29
Tabla 3: Primers utilizados para análisis moleculares.....	45
Tabla 4. Ciclos de PCR para muestras de ADN de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	46
Tabla 5. Referencias bibliográficas para temperaturas de alineamiento, con modificaciones .....	46
Tabla 6. Descripción de productos usados para evaluar el control <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	55
Tabla 7 Aislamientos obtenidos en los diferentes municipios del valle del cauca.....	59
Tabla 8. Cuadrados medios para Morfología de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	64
Tabla 9. Crecimiento radial (mm) de <i>Colletotrichum</i> spp <i>in vitro</i> a los diez (10) días después de incubación (ddi).....	64
Tabla 10. Tamaño en $\mu\text{m}$ de conidias de <i>Colletotrichum</i> spp Largo ( $\mu\text{m}$ ).....	67
Tabla 11. Tamaño en $\mu\text{m}$ de conidias de <i>Colletotrichum</i> spp Ancho ( $\mu\text{m}$ ). ....	69
Tabla 12. Tamaño en $\mu\text{m}$ de conidias de <i>Colletotrichum</i> spp Area ( $\mu\text{m}^2$ ).....	72
Tabla 13. Características generales de los diferentes aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	78
Tabla 14: Identificación Aislamientos Por Métodos Moleculares .....	89
Tabla 15. Cuadrados medios para patogenicidad de <i>Colletotrichum</i> spp.....	112
Tabla 16: Patogenicidad de las cepas en los municipios muestreados .....	113

## Introducción

El aguacate Hass es uno de los principales cultivares comerciales en el mundo, y es el resultado de la combinación de un 85 a 90% de raza Guatemalteca y 10 a 15% de la Mexicana, lo que le confiere una mejor adaptación tanto a zonas templadas como cálidas. Esta variedad fue obtenida de una mutación espontánea en Habra Heights, California en 1927, donde los frutos fueron escogidos y patentados por Rudolf G. Hass en 1935, debido a su alta productividad, calidad de pulpa y madurez más tardía que la variedad Fuerte (Baiza, 2003; Bernal y Díaz, 2005; Barrientos, 2010; Tupaz *et al*, 2013).

La variedad Hass, posee un hábito de crecimiento erecto, con copa redondeada y grupo floral tipo A, es decir, que sus flores tienen estigma receptivo en la mañana, se cierran al medio día, y en la mañana del día siguiente se abren de nuevo con sus anteras las que son receptivas, por esta razón, se deben cultivar las variedades Ettinger y Fuerte, que se constituyen como polinizadores (Tupaz *et al*, 2013). Esta variedad produce frutos pequeños, ovoides a periformes, con un peso entre 150 a 300 gramos, una longitud de 8 a 10cm de largo, exocarpio grueso y semirrugoso un tanto coriáceo, semilla adherida a la cavidad, el cual al madurar pasa de un color verde a morado oscuro casi negro, la pulpa es de color verde crema, sin fibra, de excelente sabor y con un porcentaje de aceites que varía entre un 17 a 23%; además posee una excelente capacidad de almacenamiento y transporte, lo que le confiere calidad culinaria y gran demanda a nivel mundial (Baiza, 2003; ICA, 2012; Bartoli y Ángel, 2008; Téliz y Mora, 2007).

En Colombia, el aguacate Hass se puede cultivar desde los 1000 a 2500 m.s.n.m., sin embargo, estudios realizados por Bernal *et al*, 2011 demuestran que las condiciones óptimas para el desarrollo del aguacate Hass es el clima frío moderado (1800 a 2600 m.s.n.m.), en donde se obtienen porcentajes de pulpa entre el 68 al 70% y un peso de calidad extra que corresponde a más de 180 g por fruto. Esta especie se caracteriza por

su uso para consumo directo gracias a sus contenidos de proteínas, vitaminas y minerales que contribuyen a reducir los niveles de colesterol y el control de enfermedades cardíacas y en la industria para la fabricación de cosméticos y aceites (Baiza, 2003), lo que indica múltiples opciones de transformación. (Ríos Castaño, 2005).

En Colombia, esta variedad se encuentra establecida en las regiones productoras al Oriente y Suroeste Antioqueño, el Norte de Tolima, Eje Cafetero, la Meseta de Popayán y el Norte del Valle (Yabrudy, 2012; ICA, 2012). El rendimiento promedio de la producción por hectárea ha alcanzado valores superiores a los registrados por los mayores productores, con 12.4 a 18.8 ton/ha en árboles de 8 a 9 años de edad (Tupaz *et al*, 2013). Además, para finales del año 2015, según datos de Agronet y el Consejo Nacional de Aguacate en Colombia había 13.530 hectáreas sembradas en aguacate Hass, de las cuales 7.323 fueron cosechadas, lo que representó una producción total de 58.581 toneladas, con un rendimiento promedio de 8 ton/ha.

La antracnosis, causada por el hongo *Glomerella cingulata* (Stoneman) spauld. & Schrenk. (Anamorfo *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.). (Bernal E., J.A.; Diaz D.; C.A. 2008.), es uno de los géneros más patogénicos en un gran número de especies de plantas en regiones tropicales y subtropicales (Cannon *et al*, 2012), y que afecta el cultivo del aguacate en todos los países donde se cultiva, todas las etapas de desarrollo y diferentes órganos de la planta, y el daño en frutos demerita la calidad en precosecha, cosecha y poscosecha, con pérdida total de la calidad y es considerado un factor limitante para su exportación (Téliz y Mora, 2007). La antracnosis es una de las principales enfermedades que afecta la calidad del fruto y puede llegar a causar pérdidas cercanas al 20% (Molano, 2012; Rodríguez-López *et al.*, 2009); Vidales *et al.*, 2005 menciona que esta enfermedad afecta en un 10% el amarre de la flor y el fruto produciendo abortos, disminuyendo la producción y calidad en un 30%, siendo una de las enfermedades de mayor importancia económica en las zonas productoras de aguacate en Colombia.

La antracnosis afecta ramas, hojas, botones florales y frutos, produciendo lesiones necróticas con muerte descendente de ramas, y aborto de flores y frutos en formación. En los frutos, se presentan lesiones hundidas de color negro, sin bordes definidos, y sobre las cuales se puede observar masas de color salmón que corresponden a la esporulación de las conidias y una pudrición interna de la pulpa o mesocarpio (ICA 2012, Bernal y Díaz, 2005; Bartoli y Ángel, 2008; Molano, 2012). En cultivos tropicales como aguacate, mango, musáceas, papaya, tomate de árbol, café, el agente causal de la enfermedad permanece latente durante el ciclo de cultivo y los síntomas visibles se manifiestan en el periodo de cosecha y postcosecha, lo que reduce la calidad y cantidad de la producción y rendimiento (Agrios, 2005; Cannon *et al*, 2012). Las infecciones latentes se deben a la presencia del compuesto *cis, cis 1- acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12-15 dieno* presente en la epidermis de los frutos inmaduros, el cual decrece al llegar el período de madurez fisiológica, volviendo el fruto más susceptible a la infección (Téliz y Mora, 2007).

El proceso de infección y colonización del tejido vegetal por *Colletotrichum* spp., se caracteriza porque la infección primaria puede ser realizada por ascosporas y conidias, y la infección secundaria por conidias, que al adherirse al tejido vegetal y en respuesta a reacciones químicas y físicas del hospedero, condiciones ambientales adecuadas (temperatura y humedad relativa alta), desarrollan el tubo germinativo el cual penetra el tejido vegetal directamente por la cutícula o a través de los estomas o heridas y que una vez dentro, se desarrollan los haustorios y el micelio, permaneciendo latentes hasta la cosecha y poscosecha, donde finalmente el tejido vegetal colapsa, se produce la necrosis y posterior rompimiento del exocarpio, desarrollo de acérvulos y producción de conidias, constituyéndose en un nuevo foco de infección, que dará origen a un nuevo ciclo, el cual es favorecido por la humedad relativa (HR) superior al 80% y temperaturas mayores a 25°C (Téliz y Mora, 2007; Agrios, 2005).

Colombia necesita dedicar esfuerzos en el área fitosanitaria, calidad e inocuidad agroalimentaria, ya que el mayor problema son los altos estándares de calidad, exigidos para exportar, siendo necesario desarrollar una cadena de valor agregado tanto en producción como en poscosecha y comercialización, que respondan a las exigencias de

los mercados. Las exportaciones de aguacate var. Hass, en nuestro país van en aumento y para satisfacer la demanda de mercados de Estados Unidos, Asia y Europa, se deben cumplir con requisitos de orden fitosanitario y comercial, que garanticen la inocuidad del producto, que debe darse con el registro de los predios, límites máximos de residuos (LMR), productos fitosanitarios e ingredientes activos permitidos y registrados en el control de plagas y enfermedades, alto nivel de adopción y certificación en BPA, que respalden al productor y exportador (ASOHOFrucol 2015).

Colombia, para este frutal en particular, no se tienen estudios de identificación y caracterización de las especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de aguacate *Persea americana* var. Hass y no existen evaluaciones de estrategias de manejo a nivel de campo y poscosecha actualizados. Por lo tanto, se hace necesario identificar y caracterizar aislamientos asociados a pudriciones de frutas, mediante técnicas moleculares y morfológicas, evaluar la patogenicidad y determinar la sensibilidad *in-vitro* de los diferentes aislamientos de *Colletotrichum* spp a productos de síntesis química y biológica, colectados en los diferentes municipios del Valle del Cauca donde se cultiva aguacate var. Hass, para caracterizar las localidades muestreadas en función de las variables objeto de estudio, permitiendo identificar el estado de dichas zonas en relación al patógeno.

Para el conocimiento de las especies de *Colletotrichum* spp., causantes de antracnosis en aguacate se han realizado estudios a nivel morfológico, molecular y patogénico, que permitan identificar y clasificar las especies dentro del mismo género y a la vez determinar su variabilidad y distribución geográfica (Velázquez *et al*, 2016; Hernández *et al*, 2015; Gañán *et al*, 2015; Silva & Quezada, 2011; Freeman *et al*, 1996;). En la identificación y caracterización molecular de estas especies se tiene como base la obtención y extracción de ADN, para análisis del genoma utilizando técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis filogenéticos multilocus utilizando la región espaciadora interna (ITS) del ADN ribosomal (ADNr) o regiones pertenecientes a esta (Gañán *et al*, 2015), enzimas de restricción para la identificación de diferencias interespecíficas (Álvarez *et al*, 2004), amplificación de microsatélites (RAMs), PCR con primers arbitrarios AFPLs (Álvarez *et al*, 2007), entre otras.

Los procesos de análisis filogenéticos involucran el análisis del genoma, en donde la ubicación de regiones conservadas y repetitivas permite relacionar un fragmento de ADN producto de PCR con una serie de primers universales y específicos que se alinean mediante secuenciación y producen copias que son analizadas y agrupadas en una secuencia consenso, a partir de la cual, mediante análisis bioinformáticos se realiza la comparación de similitud en la secuencia de nucleótidos, determinando los polimorfismos, relaciones con un ancestro y distancias genéticas entre las especies de un mismo género y dentro una misma región geográfica o diferentes regiones geográficas. Todo esto permite realizar árboles filogenéticos, donde se concluye la ubicación de cada organismo dentro del género, especie, clado y/o raza (Cannon *et al*, 2012; Damm *et al*, 2012; Weir *et al*, 2012). Para el aguacate (*P. americana*), se han realizado estudios de caracterización morfológica, patogénica y molecular de las especies de *Colletotrichum* spp., que están asociadas a este cultivo y responsables de problemas fitosanitarios, donde actualmente se encuentra el registro de: *Colletotrichum acutatum* (Damm, *et al* 2012; Lardner *et al*, 1999), *Colletotrichum boninense* (Silva & Quezada, 2011), *Colletotrichum gloeosporioides* (Freeman *et al*, 2000; Freeman *et al*, 1996;), *Colletotrichum godetiae* (Hernández *et al*, 2015), *Colletotrichum karstii* (Velázquez *et al*, 2016). Esta diversidad permite determinar la capacidad de dispersión, variabilidad e infección de las diferentes especies de este género con respecto a este cultivar.

El aguacate Hass en Colombia, es uno de los cultivos que hacen parte del Plan Nacional de Desarrollo y que en el sector agrícola tiene como objetivo mejorar los procesos agronómicos de producción, rendimiento y calidad fitosanitaria requerida para obtener productos inocuos y aptos para el mercado exportador, teniendo como destino Estados Unidos y Europa. Por lo anterior, se plantea la siguiente hipótesis “existen diferentes especies del género *Colletotrichum* causando antracnosis en aguacate Hass y pueden ser identificadas y caracterizadas por su genotipo, fenotipo, patogenicidad y sensibilidad a diferentes moléculas de control”. Por consiguiente se propone como objetivo general identificar genotípicamente y caracterizar el fenotipo, la patogenicidad y su sensibilidad a moléculas de control de diferentes especies de *Colletotrichum* spp, asociadas a antracnosis en aguacate Hass y como objetivos específicos Identificar las especies de *Colletotrichum* spp asociadas a antracnosis, mediante el uso de marcadores moleculares, caracterizar la morfología, patogenicidad y sensibilidad a moléculas de

síntesis química y biológica, en el control de las diferentes especies de *Colletotrichum* spp, aisladas en frutos de aguacate Hass, provenientes de diferentes municipios del departamento del Valle del Cauca, y que constituyen las especies responsables de antracnosis.

Con el objeto de conocer su variabilidad y diversidad entre las diferentes zonas de muestreo, se contribuye también en los análisis morfológicos y patogénicos, estableciendo la variabilidad y distribución dentro del Departamento, que permitan el reconocimiento del patógeno y el establecimiento adecuado de medidas de control en programas de manejo integrado de enfermedades, que garanticen la inocuidad y calidad del producto, proyectado como un renglón importante de la exportación agrícola de Colombia

# 1. Revisión de Literatura

## 1.1 Importancia del aguacate *Persea americana* var. Hass

El Aguacate (*Persea americana* Mill.), es una especie exótica perteneciente a la familia Lauraceae), formado por 150 especies, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, abarcando Asia, Islas Canarias y América (Corpoica, 2005). Colombia posee diferentes zonas ambientales y agroecológicas favorables, que permiten producir en diferentes épocas del año, disponiendo de diferentes altitudes y variedades, con elevado potencial productivo, siendo muy atractivo para oportunidades de inversión, traducido en alta rentabilidad, creación de empleo y desarrollo para la economía del país, ya que se pueden aprovechar varias ventanas a lo largo del año para un suministro continuo.

En Colombia el cultivo del aguacate variedad Hass durante los últimos años ha venido aumentando el área de siembra, ya que este se constituye como uno de los productos de mayor demanda para el sector de exportación, principalmente hacia mercados norteamericanos y europeos; este crecimiento e importancia se refleja en las alianzas que empresas exportadoras presentes han realizado con diferentes productores en los principales departamentos en donde el aguacate Hass hace parte del renglón productivo y agrícola del país. En la exportación de un producto es necesario cumplir con requisitos de fitosanidad que aseguren calidad e inocuidad, es decir, que además de contar con las condiciones edafoclimáticas necesarias para el desarrollo y crecimiento del cultivo, también se realicen buenas prácticas agrícolas (BPA), enfocadas en la protección fitosanitaria, donde el manejo de enfermedades tanto en campo como en cosecha y postcosecha garanticen un producto de calidad en el aspecto estético, inocuo, valor nutricional y organoléptico.

## 1.2 Origen del aguacate

El Aguacate (*Persea americana* Mill.), es de origen Américo, de las cordilleras central y oriental de México y de las serranías de Guatemala, distribuida desde la época colonial por Centro América hasta Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú (Corpoica, 2008; Teliz y Mora, 2007; Bernal y Díaz, 2005; Ortiz y Rangel, 2002. Según FAOSTAT (2015), para el año 2013 se alcanzó una producción total mundial de 4.717.102 toneladas, siendo los principales productores México, República Dominicana, Colombia, Perú e Indonesia. En Colombia, la producción para este mismo año fue de 303.352 toneladas en un total de 32.066 hectáreas cosechadas, siendo los principales productores los departamentos de Tolima (20,8%), Antioquia (15,8%), Caldas (13,1%), Bolívar (10,0%), Santander (9,0%) y Valle del Cauca (7,6%) (Agronet, 2015).

Dentro de la clasificación genética y morfológica de todas las especies de aguacate cultivadas y consumidas alrededor del mundo, se incluyen tres subespecies o razas ecológicas que son: Mexicana, Guatemalteca y Antillana, las cuales se agrupan de acuerdo a su adaptación a diferentes condiciones edafoclimáticas, resultado de su proceso evolutivo (Baiza, 2003. Barrientos, 2010).

## 1.3 Importancia económica

En el mundo, representa una fuente económica importante, con una participación en la producción de México con el 30%, seguido de República Dominicana 8%, Colombia 7%, Perú 5.7%, Indonesia 6%, Colombia 6%, Kenya 4%, Estados Unidos 3%, Ruanda 3%, Chile 3% , Brasil 3% y otros 27%, de éstos países México y Chile son los principales exportadores debido a que su consumo ha aumentado, principalmente en los países importadores, entre los que se encuentran Estados Unidos 48%, Francia 15.2%, Países Bajos (Holanda) 8.7%, Reino Unido 6.1%, Japón 3.7%, Alemania 2.9%, España 3.4%, Canadá 3.2%, Australia 1.1% y Bélgica 0.6%.(Faostat, 2014). (Figura 1).

**Figura 1. El aguacate en el mundo**

**Fuente:** FAOSTAT, 2015

El aguacate cultivado en Colombia corresponde a las razas Antillana, Guatemalteca y Mexicana e híbridos entre ellas, siendo las variedades más cultivadas Lorena, Trinidad, Booth-8, Fuerte, Hass, Trapo, Santana, Colinred y Etinger (FINAGRO, tomado de <http://m.elcolombiano.com/article/55816>)

El Ministerio de Agricultura (2016), considera el aguacate una fruta con condición”, por su potencial como producto exportable, pero con algunas limitaciones:

- Desarrollar estrategias para lograr el mercado de Estados Unidos.
- Implementar sistema de trazabilidad para ingreso al mercado de la Unión Europea.
- Transferencia de tecnología para el cultivo de las variedades exportables.

El cultivo de aguacate puede ser afectado por diferentes enfermedades de importancia económica, por lo que requiere protección del cultivo a diferentes fitopatógenos. El uso de fungicidas y/o moléculas de síntesis química ha demostrado ser efectivos, pero su uso

continuo provoca con el tiempo resistencias o variaciones en las cepas de los patógenos controlados.

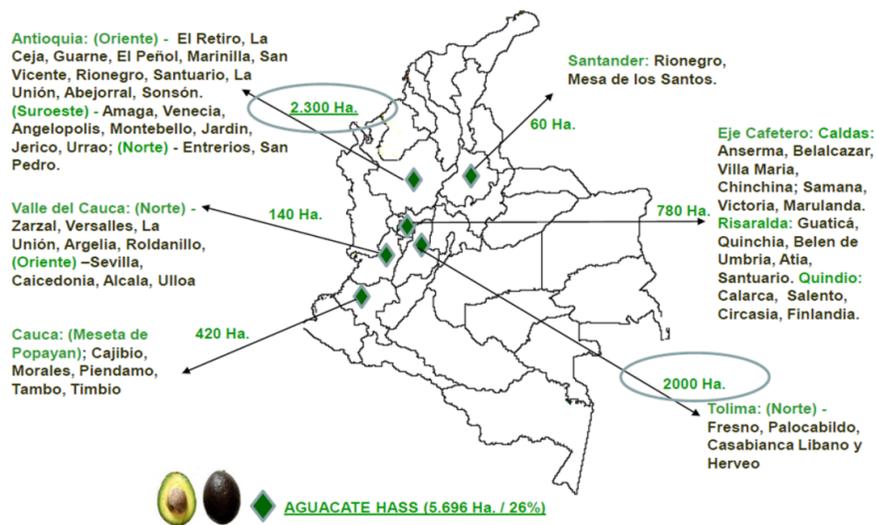
La antracnosis es una de las enfermedades más importantes que afectan el aguacate a nivel mundial y nacional, debido a la severidad de los daños que ocasiona, la magnitud de las pérdidas generadas por la enfermedad tanto en producción como en calidad de la cosecha y a la dificultad que se presenta para su control.

Colombia presenta una ventaja comparativa con el rendimiento del cultivo a nivel mundial, lo que lo hace productivamente competitivo. Esto le exige al país fortalecer la calidad del producto, los procesos de cosecha, postcosecha y el mejoramiento en el control fitosanitario.

En el país las épocas de cosecha están directamente relacionadas con la altitud en la cual está cultivado, siendo las épocas más tempranas en climas cálidos y las más tardías en climas fríos, factor que favorece la disponibilidad de la producción. El calendario de producción para el oriente antioqueño va de diciembre a mayo; Suroeste de Antioquia octubre a enero; Norte del Tolima octubre a enero, mayo a junio; Eje cafetero octubre a febrero; Meseta de Popayán septiembre a diciembre y Norte del Valle de septiembre a enero, con baja producción en el tercer trimestre del año. Los núcleos productores de aguacate Hass en Colombia están ubicados en la región Andina, zonas de ladera.

(Figura 2, Tabla 1).

**Figura 2. Principales núcleos productores de aguacate Hass en Colombia**



Fuente: Consejo Nacional del Aguacate. 2015.

**Tabla 1. Principales núcleos productores de aguacate Hass en Colombia**

Departamentos	Area (has)	Municipios	Calendario cosecha
Antioquia (oriente)	2.300	El Retiro, La Ceja, Guarne, El Peñol, Marinilla, San Vicente, Río Negro, Santuario, La Unión, Abejorral y Sonsón.	Diciembre- mayo
Antioquia (suroeste)		Amaga, Venecia, Angelópolis, Montebello, Jardín, Jericó y Urrao	Octubre- enero
Antioquia (norte)		Entre Ríos y San Pedro	
Tolima (norte)	2.000	Fresno, Palocabildo, Casablanca Líbano y Herveo	Enero, Mayo-junio, Octubre- diciembre
Eje cafetero	780		Enero-Febrero y octubre-diciembre.
Caldas		Anserma, Belalcázar, Villa María, Chinchiná, Samaná, Victoria y Marulanda	
Risaralda		Guaticá, Quinchia, Belén de Umbría, Atia y Santuario	
Quindío		Calarcá, Salento, Circasia y Finlandia	
Cauca	420	Cajibío, Morales, Piendamó Tambo, Timbio y Sotará.	Septiembre- diciembre
Valle del cauca	140	Versalles, La Unión, Argelia, Roldanillo, Sevilla y Caicedonia	Septiembre- Enero
* Valle del cauca		El Dovio, El Cairo (Levante), Toro, Trujillo, Río Frío, Bolívar, Yotoco, Palmira y Restrepo	
Santander	60	Río Negro y Mesa de los Santos	
Total	5.700	Correspondiente a un 26% de la producción nacional	

Fuente: Consejo Nacional del Aguacate. 2015.

## 1.4 Antracnosis

La antracnosis, del griego “carbón”, son enfermedades del follaje, flores, tallos y frutos de diversas plantas, que causan lesiones necróticas deprimidas de color gris con borde oscuro ligeramente levantado y que aumentan de tamaño a medida que la lesión avanza y sobre las cuales pueden desarrollar los acérvulos, que generalmente crecen en anillos concéntricos desarrollando masas de esporas asexuales o conidios (Agrios, 2005).

Los hongos que producen acérvulos son los del orden Melanconiales como el *Colletotrichum* o *Glomerella*, *Coryneum*, *Melanconium*. Las principales antracnosis son causadas por hongos como: *Elsinoe* sp, *Diplocarpum* sp y *Glomerella* sp. Todos estos hongos invernan en forma de micelio y conidios y producen ascosporas en peritecios.

## 1.5 Agente causal

Las especies de *Colletotrichum* sp., son causantes de antracnosis en diversos cultivos. En el proceso de colonización de la planta, se presentan dos fases de nutrición: la fase biotrófica, donde el patógeno obtiene los alimentos de las células vivas de la planta huésped, y la fase necrotrófica, donde los alimentos los obtiene de las células muertas del hospedero que han sufrido el ataque del patógeno (Bailey et al., 1992). La fase biotrófica es muy corta y en ella se asegura el establecimiento del patógeno, dando lugar a la expresión enzimática sobre la pared celular, cuyos daños son leves en el tejido vegetal, no se desencadenan respuestas de defensa, al parecer porque la planta no reconoce a su huésped. En la fase necrotrófica, se presentan los síntomas de la antracnosis, donde presenta un incremento en la expresión enzimática, degradando la pared celular y se activa la virulencia del patógeno (Centis et al., 1997). Hongos asociados a la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) que se presentan en pre y postcosecha, incrementa del pH del medio en el crecimiento necrótrofo como en el saprófito y tienen la relación directa con la activación de enzimas relacionadas con la degradación de pectinas.

## 1.6 Infección de *Colletotrichum* spp

La antracnosis causada por el hongo *Glomerella cingulata*, teleomorfo o fase sexual y *Colletotrichum gloeosporioides*, su anamorfo o fase asexual, es la especie predominante en cultivos de importancia económica; afectando un gran número de plantas en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Esta enfermedad, se presenta en todas las zonas productoras de aguacate y afecta significativamente la comercialización. Este patógeno presenta una gran variabilidad genética y fenotípica para muchas especies de plantas (Téliz y Mora, 2007).

En aguacate *Colletotrichum* spp, afecta diferentes partes de la planta, como es raíz, tallo, hojas, inflorescencias y frutos, siendo los conidios la fuente de inóculo, que son diseminados por el agua o el viento (Téliz y Mora, 2007), y las infecciones en etapa precosecha y poscosecha generan grandes pérdidas para el productor y comercializador. Los golpes, heridas y otros daños físicos, junto con las fluctuaciones de temperatura y el exceso de humedad, son factores que favorecen el crecimiento de este patógeno en los frutos.

El patógeno es incapaz de colonizar el tejido inmaduro debido a la presencia del compuesto antifúngico *cis*, *cis*-1-acetoxy-2-hidroxy-4-oxo-heneicosano-12,15 dieno, que es la base de la resistencia y es considerado como un inhibidor estático (Prusky et al., 1982, 1983, 1996 y Beno- Moualem 2000, Bailey y Jeger, 1992, tomado de Téliz y Mora, 2007) presentes en el pericarpio, que no permite el desarrollo de micelio ni germinación de conidios ya que durante el desarrollo de los frutos estos se encuentran latentes (Prusky et al., 1983, tomado de Téliz y Mora, 2007), y durante la madurez fisiológica los niveles de dieno (metabolizado por la enzima lipoxigenasa, actividad regulada por flavin-3-ol, epicatequina) disminuyen, permitiendo que el patógeno continúe su crecimiento y colonización (Whiley et al., 2007), ya que al desaparecer el compuesto, poscosecha el fruto se torna más susceptible al patógeno (Prusky et al., 1983, tomado de Téliz y Mora, 2007).

En el proceso de infección de *Colletotrichum* spp, se presentan tres etapas de desarrollo del patógeno como es la adhesión de esporas, germinación y formación del apresorio y penetración de la hifa, que puede ser cuticular y /o subcuticular. Cuando el patógeno invade el fruto degrada las células, necrosa tejidos acompañado de rompimiento mecánico de la epidermis, con formación del acérvulo con sus setas, conidióforos y conidios; y consecuente pudrición de la pulpa (Telliz y Mora, 2007). Rodríguez et al 2009, sugiere que los síntomas de la antracnosis pueden asociarse a la degradación de polifenoles, plasmólisis, necrosis y desintegración celular.

## 1.7 Sintomatología

Los síntomas de antracnosis se presentan en frutos, hojas, ramas e inflorescencias y su severidad está correlacionada a la humedad relativa alta y prolongada (Ávila et al, 2002), y su nivel de daño varía según el órgano afectado.

En cojines florales el daño se manifiesta como tizones y en frutos recién formados se producen abortos. En frutos, los síntomas iniciales aparecen como lesiones pequeñas color café claro y al crecer la lesión se torna hundida en el centro y cambia a color café oscuro o negro. Bajo condiciones de humedad relativa alta, aparecen masas de esporas de color salmón en los acérvulos. (Ochoa A., 2009).

Los daños por *Colletotrichum* sp, en la etapa de poscosecha, se presentan en diferentes partes del fruto, como manchas redondas de tamaño variable, color marrón a café claro, levemente deprimidas en su centro y sin bordes definidos y sobre ellos crecen masas de esporas color salmón. Corpoica, 2005.

En Colombia, se han realizado investigaciones sobre caracterización morfológica y molecular de *C. gloeosporioides* en guanábana *Annona muricata*, Valle del Cauca, 2005 y Estudios de especies asociadas con antracnosis en mora de castilla *Rubus glaucus*,

Álvarez, E, 2007. En aguacate, se desconoce la caracterización morfológica y molecular de la diversidad de especies del género *Colletotrichum*.

### 1.7.1. Rango de hospederos

Las principales antracnosis son causadas por *Elsinoe* sp, *Diplocarpum* sp y *Glomerella* sp. Todos estos hongos invernan en forma de micelio, conidios y producen ascosporas en peritecios (Agrios, 2005). A continuación, se describe las especies de más representativas que afectan el aguacate:

- ***Glomerella* spp**

Produce antracnosis en manzana o pudrición amarga, pudrición de la vid, (*G cingulata*) antracnosis en soya (*G. glycines*), algodón (*G. gossypii*) y frijol *G. lindemathianum*). Produce muerte descendente, debido a que este patógeno puede hallarse en las semillas, sobre las que se presentan lesiones hundidas de color café, que al emerger los cotiledones desarrollan manchas pardas, ataca pecíolos y nervaduras. En el algodón cubre las bellotas con muchas lesiones y en frutos ocasiona pudrición. En vid, afecta frutos en desarrollo y en poscosecha, cuyo daño se manifiesta como manchas cafés, y al avanzar las lesiones aparecen pústulas con masas mucilaginosas de esporas rosadas, los frutos se arrugan y se momifican (Agrios, 2005).

En la etapa conidial de *Colletotrichum*, las esporas destruyen los cotiledones, el hipocótilo, y en el tallo produce manchas superficiales y las lesiones se cubren con esporas rosadas. En frutos, proliferan los acérvulos sobre los que se desarrollan masas de esporas, el tejido se arruga y se hunde (Agrios, 2005).

- ***Colletotrichum* spp**

Antracnosis en cereales y pastos (*C. graminícola*), antracnosis en cucurbitáceas (*C. lagenarium*); antracnosis en frijol (*C. truncatum*); antracnosis en tomate y berenjena (*C.*

*phomoides*); pudrición de la caña de azúcar (*C. falcatum*), antracnosis en hortalizas como nabo, coliflor, espinaca, cebolla (*C. circinans*). En los cereales afecta las plántulas, y en plantas jóvenes afecta tejidos de la corona y base del tallo; plantas adultas se ven afectadas las brácteas y espigas, la planta disminuye su crecimiento y presenta manchas foliares. En cucurbitáceas, la antracnosis aparece a través de lesiones necróticas en hojas de 1 a 2 cm. Lesiones en pecíolos causan defoliación; en los frutos aparecen lesiones circulares hundidas, con masas de esporas sobre las lesiones. En tomate y otras hortalizas, afecta frutos, tallos y las hojas. Este patógeno también afecta plátano, berenjena, pera, manzano y pimentón, que se manifiesta como lesiones hundidas, ablandamiento de frutos y pudrición. En cebolla, causa fumagina sobre parte externa de los bulbos y en los estromas se producen acérvulos llenos de masas de esporas. En los cítricos, afecta hojas, ramas y frutos, cuyas lesiones inician con manchas foliares, deshidratación de tejidos, defoliación y muerte descendente (Agrios, 2005).

En la Fase asexual de *Glomerella*, este patógeno vive como saprofito, produce acérvulos en forma redondeada y conidios incoloros de una célula, con masas de conidios color rosado a rojizo. Los acérvulos brotan a través del tejido vegetal con forma de disco, los conidióforos son cortos. Este patógeno es favorecido por temperaturas y humedad relativa alta. Se disemina por el viento, agua, animales, insectos y herramientas (Agrios, 2005).

## 1.8 Clasificación taxonómica

Según NCBI. 2016. (National Center Biotechnology Information)

Dominio: Eukaryota  
Opisthokonta

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya  
Phyllum: Ascomycota  
Saccharomyceta

Subphyllum: Sordariomyceta

Clase: Sordariomycetes  
Subclase: Hypocreomycetidae  
Orden: Glomerellales  
Familia: Glomerellaceae  
Género: Colletotrichum

Según Catalogue of life 2017, lo clasifican:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Clase: Sordariomycetes  
Familia: Glomerellaceae  
Género: *Colletotrichum* – 424 especies  
*Glomerella*- 62 especies

## 1.9 Características del género *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* se caracteriza por conidias hialinas, unicelulares, ovoides u oblongas ubicadas en una estructura llamada acérvulo. Cuerpos en forma de disco, cerosos, subterminales y típicamente oscuros. El acérvulo presenta conidióforos y conidias en cuyo borde crecen (Según Dikman M.B., 2006, tomado de Hernández L., 2009).

Las especies reconocidas en los últimos años ha tenido una revolución en el concepto de especie de los géneros *Colletotrichum* afectando frutales, especialmente *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*, los cuales se conocen hoy como un complejo de especies, que parecen tener subgrupos con diferentes especies de hospederos, regiones geográficas, diversidad genotípica y alta variabilidad fenotípica dentro del complejo, lo que ha llevado a la generación de nuevas especies.

Se han realizado pruebas de hibridación entre especies diferentes (Damm, et al., 2002). En la especie *Colletotrichum* sp, cada clado contiene varias especies que están

filogenéticamente bien apoyados en el análisis de genes múltiples. (Weir et al., 2012). Se enfocan y describen los conceptos de especie y las relaciones anamorfo – telemorfo (Cannon, 2012).

El género *Colletotrichum* spp., es la forma anamorfa de *Glomerella* spp., y fue descrito por Corda en 1831 (Mycobank, 2016). Este género se caracteriza por la formación de acérvulos subepidérmicos, los cuales son estructuras más o menos cerradas, que al romperse liberan de su interior conidias hialinas, que pueden ser de forma cilíndrica, ovoide o en ocasiones curvadas, con las estructuras de reproducción e infecciones primarias y secundarias (Agrios, 2005).

*Colletotrichum* spp., es uno de los géneros de hongos fitopatógenos que afectan cultivos tropicales y subtropicales presentándose en todas las etapas del cultivo como en postcosecha, ya que la antracnosis que afecta ramas, flores y frutos, reduciendo los rendimientos y calidad de la cosecha. (Agrios, 2005; Pitt & Hocking, 2009).

### **1.9.1 *Colletotrichum acutatum***

Esta especie fue descrita por Simmonds en 1965, afectando *Carica papaya*, *Capsicum frutescens* y *Delphinium ajacis* en Australia (Damm et al, 2012); actualmente está registrado afectando también: fresa, mora, manzana, olivo, pinos, cítricos y aguacate (Damm et al, 2012). Morfológicamente esta especie fue diferenciada de otras por sus conidias fusiformes con extremos agudos, sin embargo, estas mismas características pueden ser encontradas en especies de *Colletotrichum gloeosporioides*, y a la vez pueden existir variaciones en el color y forma de aquellas descritas como *C. acutatum*, por tal razón, la utilización de herramientas moleculares han permitido desarrollar árboles filogenéticos en donde se ha clasificado mediante análisis multilocus un total de 5 clados y 29 subclados, que representan cada uno, una de las especies pertenecientes al complejo de *C. acutatum*. Entre las especies clasificadas e identificadas se encuentran: *C. acutatum*, *C. costarricense*, *C. lupini*, *C. tamariolli*, *C. godetiae*, *C. nymphaeae*, *C. simmondsii*, *C. fioriniae*, *C. phormii* (Damm et al, 2012). Este complejo permite determinar

que las pruebas moleculares son esenciales para conocer diferencias y similitudes en una misma especie y de esta manera asociar estas investigaciones dentro del ámbito de la agricultura y la fitopatología para desarrollar planes de manejo integrado teniendo en cuenta que la diversidad y variabilidad que cambia de una región a otra, pero también pueden estar fuertemente relacionadas variando en sus niveles de patogenicidad, debido a factores climáticos y el tipo de hospedero.

### **1.9.2 *Colletotrichum boninense***

*Colletotrichum boninense*, fue reportado y descrito por Moriwaki en el 2003, teniendo como hospederos a: *Crinum asiaticum* var *sinicum* L., *Passiflora edulis* Sims, *Cucumis melo* L., *Cymbidium* sp., *Clivia miniata* Regel, *Cattleya* sp., *Prunus mume* Siebold & Zucc., y *Dendrobium kingianum*. Esta especie se diferencia morfológicamente de *C. gloeosporioides*, por la relación entre el largo y ancho de la conidia, la presencia de una cicatriz prominente en la base de la conidia y difiere en la forma del apresorio y la ausencia en la producción de setas o fialides (Moriwaki *et al*, 2003). Estudios realizados por Damm *et al*, en el 2003 demuestran mediante análisis filogenéticos multilocus, que está hace parte de un complejo con un total de 18 clados, cada uno representando una especie de las cuales 12 fueron nuevos reportes, estas son: *C. karstii*, *C. phyllanthi*, *C. annellatum*, *C. petchii*, *C. novae-zelandiae*, *C. boninense*, *C. torulosum*, *C. cymbidiicola*, *C. oncidii*, *C. beeveri*, *C. colombiense*, *C. brassicicola*, *C. hippeastri*, *C. parsonsiae*, *C. brasiliense*, *C. dacrycarpi* y *C. constrictum*.

### **1.9.3 *Colletotrichum gloeosporioides***

Esta especie fue descrita en cítricos, por primera vez en 1884 por Penzing y Saccardo (Mycobank, 2016) y su forma teleomorfa es *Glomerella cingulata* (Stoneman 1903). *C. gloeosporioides* fue clasificado dentro de la taxonomía de Von Arx 1957 y 1970, como aquel que no tiene como hospederos especies gramíneas, con una conidia recta y de forma cilíndrica; esta descripción morfológica fue la primera en ser utilizada para clasificar esta especie, sin embargo, estas características cambian en función de las condiciones de crecimiento o de los procesos de subcultivo (Weir *et al*, 2012). Por tal

razón, los estudios y análisis moleculares son necesarios para poder diferenciar, separar y clasificar especies, proporcionando una descripción más específica de la variabilidad existente, un ejemplo de esto son los estudios realizados por Weir *et al*, en el 2012 en donde utilizando análisis multilocus con 8 primers pertenecientes a la región nuclear, se obtuvo un total de 23 clados, entre los que se destacan: *C. kahawae*, *C. musae*, *C. fruticola*, *C. alienum*, *C. nupharicola*, *C. siamense* y *C. asianum*.

## 1.10 *Colletotrichum* spp., en aguacate

El aguacate (*Persea americana*), es un cultivo tropical de gran importancia a nivel mundial gracias a su calidad culinaria y nutricional (Tupaz *et al*, 2013), según datos registrados por FAOSTAT para el año 2013, se obtuvo una producción total mundial 4.707.102 toneladas, siendo de los principales productores son: México, República Dominicana, Perú e Indonesia. Dentro de los problemas fitosanitarios que afectan el cultivo, disminuyendo su calidad y rendimiento se encuentran aquellos causados por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp., que es responsable de la muerte descendente y pudrición de los injertos en árboles de vivero, en campo produce la muerte descendente de ramas y brotes terminales, en botones florales y estados tempranos de formación de frutos produce aborto (ICA, 2012).

Los frutos pueden verse afectados tanto en campo como en poscosecha, debido a que el patógeno tiene la capacidad de permanecer latente. Los síntomas característicos de este patógeno sobre los frutos, son la formación de lesiones necróticas que pueden variar en tamaño a medida que la lesión prospera, iniciando en el exocarpio y generalmente alcanzan el mesocarpio o pulpa causando una pudrición blanda de color café; posteriormente, sobre la superficie del tejido vegetal se observa la aparición de acérvulos sobre los que se desarrollan masas de esporas de color salmón (Cannon *et al*, 2012; Molano, 2012; ICA, 2012; Nelson, 2008;). Para el manejo de esta enfermedad Tupaz *et al*, 2013; ICA, 2012, se recomienda la aplicación de un manejo integrado de enfermedades que involucra:

- Utilización de material de siembra sano.

- Manejo cultural mediante podas de aclareo que proporcionen una mayor luminosidad y aireación.
- Monitoreos para erradicar frutos o partes vegetales enfermas, utilizando las podas fitosanitarias.
- Aplicación de fungicidas específicos como Benomyl, Carbendazin, Oxicloruro de cobre y Prochloraz y se recomiendan al inicio de la floración hasta 2 a 3 semanas después del cuajamiento.
- Inmersión de frutos cosechados en suspensiones de fungicidas durante 3 minutos, junto con la desinfección de las canastillas y cuartos de almacenamiento utilizando Hipoclorito de sodio al 2%.

### **1.11 El aguacate variedad Hass, importancia para el sector agrícola de Colombia.**

El aguacate Hass en Colombia, constituye un renglón productivo de importancia en ascenso, debido a que gracias a su calidad nutricional y organoléptica, se constituye en uno de los productos agrícolas de interés para la exportación, siendo Holanda, Reino Unido, España, Francia, Panamá, Antillas Holandesas, Aruba y Canadá los principales destinos. Actualmente se realizan esfuerzos para concretar el proceso de admisibilidad a Estados Unidos y China; esto involucra el cumplimiento de medidas fitosanitarias, el fortalecimiento de los encadenamientos productivos, la mejora en la productividad y competitividad, el trabajo en conjunto con las autoridades nacionales y la promoción de la oferta exportable.

Este trabajo se ha visto reflejado en los resultados obtenidos para el 2015, donde se registró un total de 13.530 hectareas sembradas, que corresponden a 58.581 toneladas, lo que representa un aumento del 23% con respecto al periodo 2013- 2014, además que para el primer trimestre de este mismo año se consolidaron ventas por 4,6 millones de dólares, siendo esto el esfuerzo y resultado de los principales departamentos productores los cuales son: Antioquia, Santander, Valle del Cauca, Cauca, Caldas, Risaralda y Tolima (Agronet, 2016; MADER, 2016; Plan de negocio para el aguacate Hass en Colombia, 2014)

## 1.12 Caracterización molecular

Dentro de las técnicas utilizadas para el conocimiento y análisis de microorganismos se encuentra la caracterización molecular, en donde, mediante el análisis del genoma se estima la diversidad de poblaciones y de esta manera se profundiza en el conocimiento de la diversidad funcional, genética, molecular y patogénica de las comunidades y por lo tanto de las especies pertenecientes a ellas (Pallas, 2008). De esta manera, al identificar las especies causantes de un problema fitopatológico, se pueden complementar y mejorar los planes de manejo integrado de enfermedades para un cultivo en una determinada región. *Colletotrichum* spp., es uno de los géneros de hongos fitopatógenos considerado de los más importantes dentro del aspecto económico, ya que afecta la producción de frutales, leguminosas, cucurbitáceas, gramíneas como maíz, sorgo, caña de azúcar y otras especies como el café (Cannon *et al*, 2012).

Este hongo es el responsable de la enfermedad conocida como antracnosis, el cual puede afectar diferentes cultivos en diferentes etapas de producción, cosecha y poscosecha, causando síntomas como necrosis de hojas, tallos, flores y frutos, pudriciones de corona y tallo, tizones tardíos (Agrios, 2005). A lo largo de los años, la identificación de las especies pertenecientes a hongos fitopatógenos se ha enfocado en la descripción y caracterización morfológica, sin embargo, para realizar un análisis de las diferencias entre especies pertenecientes a un mismo clado, es decir, para conocer la variabilidad y diversidad de un conjunto de especies pertenecientes a una misma región o a diferentes regiones e identificar la distribución y asociación dentro de un área y su relación con los factores climáticos y otros cultivos que se encuentren asociados a este patógeno, es necesario la caracterización e identificación molecular (Pallas, 2008).

Para el género *Colletotrichum* spp., este tipo de estudios se ha realizado en base a análisis de la región espaciadora del ARN ribosomal conocida como Ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS), la que incluye genes pertenecientes a las subunidades ribosomales 18s, 5.8s y 28s, que incluyen las secuencias ITS1, ITS2, ITS4 e ITS5, siendo estos los primers universales (White *et al*, 1990). Actualmente se vienen utilizando otras regiones que en conjunto permiten los análisis multilocus, entre estas se

destacan actina (ACT),  $\beta$ -tubulin 2 (TUB), Chitin sintetasa 1 (CHS), Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH), Glutamina sintetasa (GGGS), Calmodulina (CAL) (Cannon *et al*, 2012), factor de elongación 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) (Rodríguez y Gaitán, 2007; Afanador *et al.*, 2014) y Manganese Superóxido Dismutasa (SOD2) (Weir *et al*, 2012).

En el análisis de estas secuencias se cuenta con diferentes técnicas que permiten agrupar y comparar secuencias, encontrar polimorfismos, utilizar enzimas de restricción y determinar las similitudes filogenéticas de las especies y razas pertenecientes a este género (Pállas, 2008). Por lo tanto, gracias a las técnicas moleculares y al ser el aguacate uno de los cultivos que durante su ciclo productivo y periodo de poscosecha se ve afectado por problemas de antracnosis, se han realizado a nivel mundial estudios que han permitido identificar las especies de este género responsables de la enfermedad, donde las actualmente reportadas son: *Colletotrichum acutatum* (Damm, *et al* 2012; Lardner *et al*, 1999), *Colletotrichum boninense* (Silva & Quezada, 2011), *Colletotrichum gloeosporioides* (Freeman *et al*, 1996; Freeman *et al*, 2000), *Colletotrichum godetiae* (Hernández *et al*, 2015), *Colletotrichum karstii* (Velázquez *et al*, 2016).

En Colombia se hace necesario la identificación de aquellas especies de *Colletotrichum* spp., responsables de los problemas de antracnosis en cultivos de Aguacate variedad Hass, considerado uno de los proyectos productivos que ha tenido un gran crecimiento durante los últimos años, gracias a los convenios de exportación para este producto a Europa y Estados Unidos. Identificar molecularmente estas especies permite conocer su variabilidad, relación y distribución dentro de esta región, siendo, la caracterización molecular un complemento a estudios de patogenicidad y morfología, por lo tanto, conocer la especie y sus características se contribuyendo a la creación de planes de manejo integrado del cultivo dentro del área de fitosanitaria.

Por lo anterior, es prioridad conocer las especies de *Colletotrichum* spp., que actualmente son las causantes de antracnosis en frutos de aguacate variedad Hass, conocer la variabilidad y diversidad entre las diferentes zonas de muestreo, su morfología

y patogenicidad, con el fin de desarrollar planes de manejo que garanticen la inocuidad y calidad del producto, proyectado como un renglón importante de la exportación agrícola de Colombia.

En Colombia el cultivo del aguacate variedad Hass ha venido aumentando el área de siembra durante los últimos años, ya que este se constituye como uno de los productos de mayor demanda para el sector de exportación principalmente hacia mercados norteamericanos y europeos; este crecimiento e importancia se ve reflejado en las alianzas que empresas exportadoras presentes en Colombia han realizado con diferentes productores en los principales departamentos en donde el aguacate Hass hace parte del renglón productivo y agrícola de la región.

Dentro de las técnicas utilizadas para el conocimiento y análisis de microorganismos se encuentra la caracterización molecular, en donde, mediante el análisis del genoma se estima la diversidad de poblaciones y de esta manera se profundiza en el conocimiento de la diversidad funcional, genética, molecular y patogénica de las comunidades y por lo tanto de las especies pertenecientes a ellas (Pallas, 2008). El identificar las especies causantes de un problema fitopatológico, conlleva a poder complementar y mejorar los planes de manejo integrado de enfermedades para un cultivo en una determinada región.

Por lo anterior, es prioridad conocer las especies de *Colletotrichum* spp., que actualmente son las causantes de antracnosis en frutos de aguacate variedad Hass, identificar su variabilidad y diversidad entre las diferentes zonas de muestreo, contribuyendo también a los análisis morfológicos y patogénicos, con el fin de desarrollar planes de manejo que garanticen la inocuidad y calidad del producto, proyectado como un renglón importante de la exportación agrícola de Colombia.

El ADN, es el material genético, que guarda la información hereditaria de todo organismo vivo, y la base para realización de los procesos de replicación, transcripción y traducción,

que en conjunto son el dogma de la biología molecular (Krebs *et al*, 2014). El estudio del genoma de los hongos fitopatógenos, es una herramienta básica para la caracterización, identificación y agrupación de estos organismos dentro de un análisis filogenético. Para llevar a cabo estos estudios, es necesario la extracción de ADN, amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilización de enzimas de restricción, búsqueda de polimorfismos, secuenciación y análisis multilocus, en donde similitudes y disimilitudes entre las secuencias analizadas y editadas, conduce a la formación de árboles filogenéticos que permiten agrupar las cepas de una determinada especie o complejo de especies. La diversidad encontrada es comparada y explicada junto con variables como la ubicación geográfica, la caracterización morfológica del aislamiento y el porcentaje y nivel de patogenicidad de cada aislamiento.

### **1.12.1 Región espaciadora interna (ITS)**

La región espaciadora interna transcrita, conocida como ITS, hace parte del RNA ribosomal nuclear que incluye los genes que conforman las subunidades 5.8S, 18S y 28S, las cuales son transcritas por la RNA polimerasa y tiene un tamaño aproximado entre 500 a 1000 bp (Tkacz & Lange, 2004). Esta región ha sido la más usada para el reconocimiento molecular y análisis filogenético de las especies pertenecientes al reino Fungi, ya que permite un buen análisis de reconstrucción filogenética a nivel de género y especie, teniendo en cuenta la facilidad y alta amplificación del DNA, y secuenciación de los productos de PCR analizados con esta región genómica (Pállas, 2008; Coleman, 2003).

Schoch *et al*, (2011), realizó estudios de caracterización molecular de 742 especies que representaban 17 subfilos del reino Fungi, en donde se comprueba que al comparar esta región con otras como SSU(18S subunidad grande del RNA ribosomal), LSU (28S subunidad pequeña del RNA ribosomal) y RPB1 (subunidad grande la RNA polimerasa II) se obtiene que la región ITS puede ser utilizada como código de barras para la identificación filogenética, ya que permite agrupar en función de las variaciones inter e intra genéticas de las especies.

Actualmente existen diferentes primers que han sido sintetizados para el análisis mediante PCR de esta región, los cuales son: ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS2 (5' - GCTGCGTTCTTCATCGATGC- 3'), ITS3 (5'- GCATCGATGAAGAACGCAGC- 3'), ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'), ITS5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al*, 1990), ITS1-F (5'- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA- 3') e ITS4-B (5'- CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3') (Gardes & Bruns, 1993).

### **1.12.2 Análisis multilocus**

Los análisis multilocus, conocidos por sus siglas en inglés como MLST (Multilocus sequence typing), hacen referencia a aquellos estudios de caracterización molecular en donde el ADN de interés, es analizado con múltiples secuencias de genes, es decir, que utilizando diferentes sets de primers se pueden analizar las bases evolutivas de las especies, y por lo tanto encontrar polimorfismos en las secuencias, lo que permite finalmente la identificación, y clasificación filogenética (Taylor & Fisher, 2003).

Para el género *Colletotrichum* spp., según lo reportado por Cannon *et al*, (2012), los primeros análisis multilocus realizados para este género fueron hechos por Talhinhos *et al*. (2002), donde utilizando las secuencias de ITS, TUB2 e HIS4 identificó a *C. acutatum* como agente causal de antracnosis en frijol tipo lupini. Posteriormente se realizaron estudios con GADPH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa), GS (Glutamina sintetasa) (Guerber *et al*, 2003) (Marcelino *et al*, 2008), SOD2 (Superóxido dismutasa 2) (Crunch *et al*, 2009; Moriwaki & Tsukiboshi, 2009); HIS3(Imidazol glicerol fosfato deshidratasa) (Damm *et al*, 2009), ACT (Actina) (Prihastuti *et al*, 2009) y CHS y CHS-1(Quitina sintetasa) (Yang *et al*, 2009; Yang *et al*, 2012; Weir *et al*, 2012; Damm *et al*, 2012).

### **1.12.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, consiste en un proceso de replicación del ADN que permite crear múltiples copias a partir de un solo fragmento, teniendo en cuenta

ciclos repetitivos de diferentes periodos y temperaturas de incubación, en donde, una mezcla de ADN molde, primers o cebadores específicos, una enzima de ADN termoestable, desoxirribonucleosidos trifosfatados, una enzima buffer, cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) y agua como solvente universal, permiten en 3 pasos repetitivos (desnaturalización, alineamiento y extensión) durante varios ciclos, obtener millones de copias del ADN de interés. Esta técnica es útil para la identificación de marcadores moleculares, diagnóstico de enfermedades, estudios de evolución molecular y análisis filogenéticos (Rodríguez & Barrera, 2004; Mullis, 1990).

#### **1.12.4 Herramientas bioinformáticas**

La bioinformática se describe como aquella área científica multidisciplinar, que integra ciencias como la biología molecular, genética, estadística, química e informática, en donde se tiene como objetivo organizar, analizar, entender e integrar secuencias de datos genómicos, para determinar las relaciones, diferencias y patrones evolutivos de los organismos pertenecientes a un mismo género o complejo de especies. El análisis de bases de datos bioinformáticos, conlleva la utilización de programas computacionales y modelos estadísticos, en donde la comparación entre secuencias específicas, con secuencias registradas anteriormente en las bases de datos permite encontrar homologías y polimorfismos para determinar cuál es la identidad del organismo, como es su proceso evolutivo, cual es la relación de proximidad con otras especies, y así integrar el conocimiento genómico a áreas como la fitopatología, donde junto con temáticas como patogenicidad, morfología, virulencia, distribución geográfica y hospederos, que desarrollen programas específicos de manejo integrado de enfermedades (Pallás, 2008)

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Localización de estudio**

La recolección de muestras para la presente investigación se realizó en las zonas productoras de aguacate var. Hass, en 14 municipios, se visitaron 34 fincas en el departamento del Valle del Cauca, ubicadas entre los 1.537 y 1.970 m.s.n.m. Las fincas difieren en condiciones edafoclimáticas adecuadas para su desarrollo y productividad. En cada sitio de colecta se registró la edad del cultivo, número de árboles, estado fitosanitario, asociación con otros cultivos, su ubicación geográfica y tipo de suelo (Tabla 2).

Las muestras colectadas provenían de frutos con síntomas de Antracnosis (Figura 3), en estado de madurez fisiológica. Se visitaron los municipios de El Dovio (Veredas Caña Honda y Santa Elena), Versalles (Vereda La Balsora, Bosque Culebra, Coconuco, Alto de San Marcos, Las Brisas y La Milonga), Argelia (Vereda La Estrella, El Recreo, La Bella y La Esperanza), El Cairo (Vereda La Carbonera), Caicedonia (Vereda El Frontino), Roldanillo (Vereda El Retiro y La Armenia), Toro (Vereda El Roble, Buenavista y Patio Bonito), La Unión (Corregimiento Quebrada Grande y Vereda Sabanazo), Trujillo (Vereda Tres Eldas), Río Frío (Vereda La Judea), Bolívar (Corregimiento Betania y Buenos Aires), Yotoco (Vereda Muñecos), Restrepo (Vereda Alto del Oso y Buen Vivir) y Palmira (Figura 4).

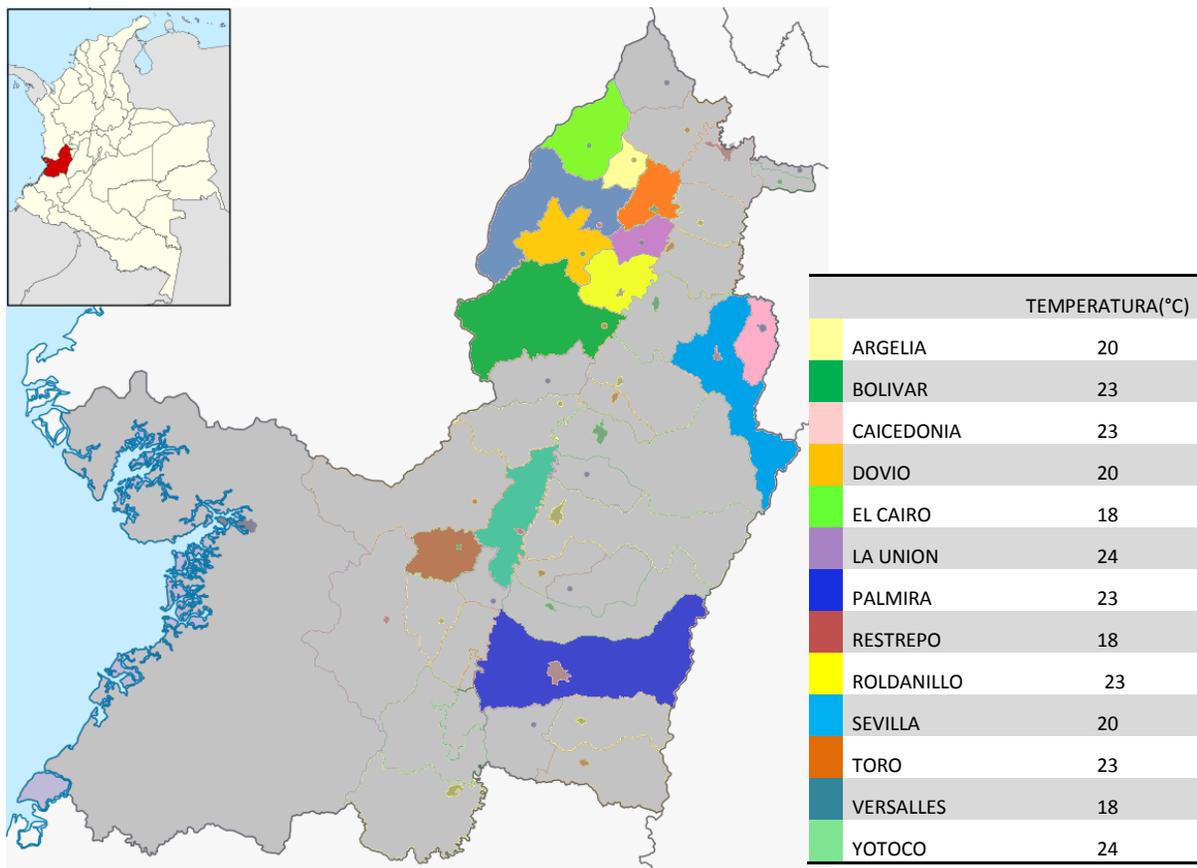
**Tabla 2: Recolección de muestras de frutos de aguacate *Persea americana* var. Hass afectados por antracnosis *Colletotrichum* spp., en el Valle del Cauca.**

FECHA	MUNICIPIO	VEREDA	FINCA	PROPIETARIO	EDAD	No. ARBOLES	SUELO	ESTADO	ASOCIACIÓN	ALTURA (m.s.n.m)	LATITUD	LONGITUD
17/02/2015		Cañada Honda	El Diamante	José Antonio López cárdenas	7 Años	130	Franco	Sano	Arracacha, maíz, frijol	1654	4°31'7,3" N	76°11'23,3" W
17/02/2015	EL DOVIO	Santa Elena	La Estrella	Ferney A, orozco	2 Años	180	Franco-Arenoso	Deficiencia Bo	Café	1585	4°34'16,4" N	76°15'15,5" W
18/02/2015	VERSALLES	La Balsora	La Grecia	EduardoJimenez	5 Años	7000	Franco	Sano	Monocultivo	1823	4°33'40" N	76°11'2,1" W
18/02/2015	VERSALLES	Bosqueculebra	El Porvenir	Miguel Antonio Castro García	2,5 Años	430	Franco	Deficiencia Bo	Monocultivo	1820	4°37'05,1" N	76°10'26,4" W
18/02/2015	VERSALLES	Coconuco	Tijuana	Juan Felipe Toro Molina	4 Años	290	Franco-Arenoso	Deficiencia Bo, lenticelosis	Monocultivo	1750	4°37'25,3" N	76°08'36,4" W
24/02/2015	ARGELIA	La Estrella	Concentración Rural Agrícola	Colegio Público	5 Años	265	Franco	Lenticelosis	Otras variedades	1484	4°43'32,2" N	76°06'55" W
24/02/2015	ARGELIA	El Recreo	El Recreo	Duber Díaz	1,5 Años	203	Franco	Sano	Café	1537	4°43'13,8" N	76°07'25,0" W
24/02/2015	ARGELIA	La Bella	La Selva	Argenis Ospina Callejas	6 Años	200	Franco	Sano	Café	1539	4°42'33,0" N	76°07'18,2" W
24/02/2015	ARGELIA	La Estrella	La Palmera	Juan Camilo Gutierrez	5 Años	2200	Franco	Sano	Platano, café	1624	4°42'33,0" N	76°07'03,5" W
27/02/2015	EL CAIRO	La Carbonera	La Aurora	José Dennis Echeverry	2 Años	3200	Franco Arenoso	Sano	Monocultivo	1936	4°46'15,8" N	76°09'50,5" W
09/03/2015	Caicedonia	El Frontino	Santa Elena	Mario Fajardo	6 Años	897	Franco	Sano	Monocultivo	1826	4°17,2'35" N	75°50,8'21" W

FECHA	MUNICIPIO	VEREDA	FINCA	PROPIETARIO	EDAD	No. ARBOLES	SUELO	ESTADO	ASOCIACIÓN	ALTURA (m.s.n.m)	LATITUD	LONGITUD
09/03/2015	Caicedonia	El Frontino	La Isla	Fabiola Manrique	3 Años	750	Franco	Sano	Monocultivo	1740	4°17,491' N	75°51,127' W
09/03/2015	Caicedonia	El Frontino	El Chaquiro	Gilberto García Manrique	5 Años	400	Franco	Sano	Monocultivo	1650	4°17'1" N	75°8,32' W
09/03/2015	Sevilla	Alto San Marcos- Las Brisas	La María	Frutales Las Lajas S.A.	6 Años	27000	Franco Arenoso	Sano	Monocultivo	1774	4°15,751' N	75°55.052' W
09/03/2015	Sevilla	Las Brisas	El chanel	Juan Carlos Leiva	6 Años	1000	Franco Arenoso	Sano	Monocultivo	1826	4°15,452' N	75°54.893' W
09/03/2015	Sevilla	La Milonga	Los Ngales	María Teresa Aranzazu	2 Años	200	Franco Arenoso	Sano	Monocultivo	1666	4°25,496' N	75°93.036' W
10/03/2015	Roldanillo	El Retiro	La Ceiba	Freddy Barandica Vivas	11 Años	600	Franco	Sano	Monocultivo	1753	4°24'9" N	76°46'10" W
10/03/2015	Roldanillo	La Armenia	Las Brumas	Nora Gómez Méndez	4 Años	2700	Franco	Sano	Monocultivo	1753	4°24'15" N	76°47'41" W
10/03/2015	Dovio	La Esperanza	La Querella	José Pastor Martínez López	7 Años	250	Franco	Sano	Monocultivo	1970	4°26'55" N	76°46'2" W
11/03/2015	Toro	El Roble	La Esperanza	Juan Bautista Orjuela	8 Años	530	Franco	Sano	Lulo	1880	4°39'56" N	76°53'33" W
11/03/2015	Toro	Buenavista	El Amaño	José Argemiro Cardona	4 Años	204	Arcilloso	Sano	Lulo	1886	4°40'27" N	76°53'22" W
11/03/2015	Toro	Patio Bonito	Villa Liceth	Alba Cecilia Hincapie	6 Años	1000	Arcilloso	Lenticelosis, daño viento	Banano	1725	4°35'25" N	76°51'58" W
11/03/2015	La Unión	Quebradagrande	El Futuro	José Seir Arboleda	3 Años	250	Franco Arcilloso	Sano	Tabaco	1721	4°33'5" N	76°50'9" W



**Figura 3. Municipios del departamento del Valle del Cauca, donde se realizaron los muestreos.**



**Fuente:**

[file:///C:/Users/user/Downloads/Colombia Valle del Cauca location map \(adm colored\).svg](file:///C:/Users/user/Downloads/Colombia%20Valle%20del%20Cauca%20location%20map%20(adm%20colored).svg). Revisión julio 2016

**Figura 4. Visita a fincas con cultivos de Aguacate var. Hass en el Valle del Cauca.**



**A** Municipio Argelia, Finca La Selva **B** Municipio El Cairo, Finca La Aurora **C** Municipio Toro, finca La Esperanza **D** Municipio Yotoco, Finca El Rubí, **E** Municipio Toro, finca Villa Liceth, **F** Municipio La Unión, Finca Futuro, **G** Municipio Roldanillo, Finca Brumas y **H** Municipio Bolívar Plazuela

**Fuente:** G.M. Cobo N., A. Figueroa V., 2015.

## **2.2 Colección de Aislamientos del Patógeno *Colletotrichum* spp**

### **2.2.1 Recolección de muestras**

Para la toma de muestras de material vegetal, se colectaron frutos de aguacate cv Hass en estado de madurez fisiológica, de diferente tamaño (con rango de 6.0 a 8 cm de diámetro). Estos frutos tenían síntomas de antracnosis, que consistían de pequeñas lesiones necróticas sobre el exocarpio de frutos (Ávila et al., 2009; Willingham et al., 2000), para aislar e identificar el agente causal de esta enfermedad (Figura 5).

Las muestras colectadas en cada finca se colocaron de manera individual en bolsas de papel dentro de bolsa plástica, de aproximadamente 20 cm de alto por 15 cm de ancho, con su respectiva identificación.

### **2.2.2 Aislamiento del patógeno**

En el Laboratorio, a partir del material vegetal colectado, se tomaron muestras de frutos de aguacate y se colocaron en cámaras húmedas durante 5 días, hasta la aparición de los primeros síntomas de antracnosis (Figura 6).

Para aislar el patógeno se realizaron cortes de una porción de exocarpio parte sana y parte enferma, de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup>. Las muestras fueron previamente lavadas con agua corriente con tween 20 durante 20 minutos, desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto, seguidamente se adicionó alcohol al 70% por 1 minuto y posteriormente 3 enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, se llevaron a la cabina de flujo laminar (CFL), se colocaron a secar sobre papel toalla estéril y posteriormente se sembraron tres (3) cajas de 5 porciones de tejido cada una de manera equidistantes en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA 39 gramos / litro de agua), ajustando el pH a 5.6 con ácido láctico al 0.2%.

**Figura 5: Muestras colectadas en incubación a la aparición de los síntomas**



**A** Frutos con madurez fisiológica colocados en cámara húmeda, para observación de los primeros síntomas y **B** Frutos en maduración a temperatura ambiente, hasta aparición de los síntomas. **C** Daños iniciales de antracnosis con necrosamiento de exocarpio y **D** Pudrición mesocarpio

**Fuente:** G.M., Cobo N., 2015.

**Figura 6: Daños por antracnosis**

**A** Puntos necróticos en exocarpio, **B** Puntos necróticos coalescen, **C** Necrosamiento de exocarpio, **D** Crecimiento micelial en punto de incisión del pedúnculo, **E** Daño en exocarpio y mesocarpio de frutos en postcosecha y **F** Presencia de acervulos y conidias en el exocarpio.

**Fuente:** G.M., Cobo N., 2015.

Las cajas rotuladas se codificaron con los respectivos aislamientos, usando para ello las siglas de su procedencia y fecha de siembra, se sellaron los bordes con Vinipel (P.V.C.: Plásticos Vinílicos de Colombia Ltda.), las cuales se llevaron a incubar de 25-30°C (Castellanos, et al., 2011; Saldarriaga, 2006, con algunas modificaciones).

El crecimiento de cada uno de los fragmentos de tejido fue observado al microscopio para la identificación del patógeno y transferido a PDA, obteniendo de esta manera los cultivos puros de cada uno de los aislamientos. Con estos aislamientos se obtuvieron cultivos monospóricos, los cuales fueron utilizados para la caracterización morfológica y molecular, pruebas de patogenicidad y control *in vitro* de fungicidas de síntesis química.

### **2.2.3 Cultivos monospóricos**

Transcurridos 7 días se identificaron y reaislaron colonias morfológicamente diferentes de *Colletotrichum* spp y que morfológicamente eran diferentes, las cuales con 8 días de incubación se sometieron a procesos de dilución en agua destilada estéril (ADE) que contenía una solución de tween-20 y se llevaron hasta 10<sup>-3</sup> de esta dilución, se adicionaron 100 µl al medio de cultivo agar-agua (AA, 15 gramos por litro de agua, Producto comercial Oxoid), se homogenizó la muestra en el medio y se eliminó el excedente de la dilución agregada y se incubó a 27°C por 15 horas, período en el cual los conidios habían germinado y con un estereoscopio se seleccionaron conidios individuales germinados y se llevaron a cuatro (4) cajas Petri pequeñas de una dimensión 6 x 1.5 cm, que contenían medio de cultivo PDA más Rifampicina como antibiótico (2ml/L). Estos se incubaron por 8 días a 27°C, para obtener cultivos monospóricos.

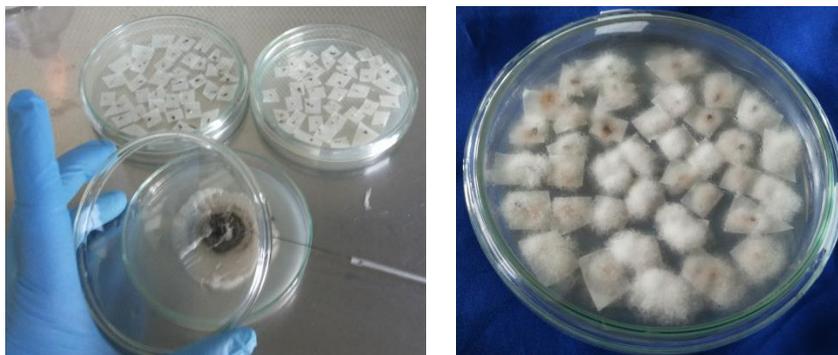
Pasados 8 días se seleccionaron las colonias diferentes y se procedió a realizar cortes con un sacabocados de medio y micelio, se guardaron en crio viales que contenían agua destilada estéril (ADE) y se llevaron a una temperatura de 4°C, para utilizarlos en nuevas siembras. Se identificaron con número y código cada cepa de *Colletotrichum*

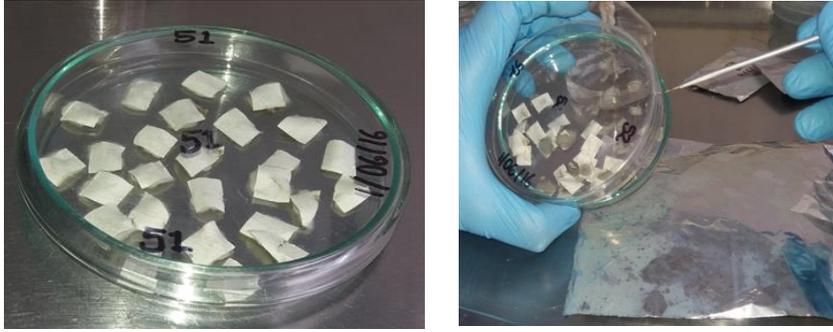
spp, que serían posteriormente usadas para la caracterización morfológica, molecular y pruebas de patogenicidad.

Para procesos de conservación a largo plazo, se colocó papel filtro estéril de 1 cm<sup>2</sup> en cajas Petri que contenían PDA, y sobre las cuales se adicionó micelio de cada cepa monospòrica. Transcurridos tres (3) días con la ayuda de una pinza estéril, los papeles filtro con los crecimientos fúngicos se pasaron a cajas Petri estériles en posición invertida, se rotularon y se colocaron en bolsas de papel y se llevaron a incubadora, a una temperatura de 37°C por 3 días, para su secado; terminado este proceso, se llevaron a cabina de flujo laminar (CFL) y pasaron a papel aluminio estéril, rotulando cada una de las muestras, se llevaron a bolsa de papel y luego a bolsa plástica, para su posterior almacenamiento en refrigeración a la una temperatura de -20°C.

Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas con el fin de conservar los 59 cultivos monospòricos aislados (Saldarriaga, 2006; Botero, 2001; con algunas modificaciones). A cada cultivo monospòricos se le asignó un número de registro de entrada a la colección y que serán utilizados para cada una de las pruebas. (Silva-Rojas, H. V. y Ávila-Quezada, G. D. 2011). (Figura 7).

**Figura 7: Métodos de conservación de cultivos monospòricos**





**A** Siembra sobre PDA en papel filtro **B** Crecimiento de *Colletotrichum* spp sobre papel filtro **C** *Colletotrichum* spp sobre papel filtro para secado **D** Conservación de aislamiento *Colletotrichum* spp en papel filtro

**Fuente:** G.M., Cobo N., 2015

## 2.3 Caracterización Morfológica

### 2.3.1 Características morfológicas y de crecimiento

Para identificación del estado anamorfo se utilizaron las claves de Barnett y Hunter, 1998 y para el teleomorfo se tomó como base la descripción de Mordue, 1971. Para estudiar las características morfológicas, se tomaron porciones de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> con un sacabocados de agar que contenían micelio en crecimiento de cada aislamiento de *Colletotrichum* spp., estos se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo PDA más el antibiótico Rifampicina, se incubaron a 27°C aproximadamente con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad en por un lapso de 7 días.

Los diámetros de colonias (mm) se registraron diariamente durante una (1) semana para determinar las tasas de crecimiento. Para cada aislamiento, se midió el largo y ancho de 50 conidios, y el color de las colonias se determinó a través de la carta de colores The Online Auction Color Chart TM (Afanador et al 2014).

El tamaño, forma y color de las masas de conidios y otras características claves de cada estructura se obtuvieron y se registraron con micrografías (Silva-Rojas y Ávila-

Quezada, 2011). Este estudio se desarrollo en el laboratorio de Microscopia Electrónica de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

#### ▪ **2.3.1.1. Crecimiento de colonias**

Para determinar el crecimiento de colonias de las cepas de *Colletotrichum* spp, se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro repeticiones. Las cepas provenientes de cultivos monoconidiales se sembraron en cajas de Petri en medio de cultivo PDA con el antibiótico Rifampicina, de las cuales se conservaron discos de medio con crecimiento de cada uno de los aislamientos, en agua destilada estéril a una temperatura de 40C, colocando un disco de micelio de 5 mm en la parte central de las cajas e incubados a 27° C en oscuridad. Para establecer el crecimiento, se realizaron seguimientos diarios durante 10 días, donde se midió el radio de cada una de las cepas. Esta metodología fue tomada de (Barcelos L. et al; 2014).

La caracterización morfológica se realizó 10 días después de la siembra de los cultivos monospóricos, la cual comprendió la evaluación del color de cada una de las colonias y el tipo de micelio (aéreo denso ó superficial) y el crecimiento de cada uno de los aislamientos colectados, para lo cual se medía el diámetro de la colonia cada 24 horas durante 10 días.

#### ▪ **2.3.1.2. Clasificación de las colonias**

Para la evaluación de las cepas monoconidiales, se tuvieron en cuenta variables morfológicas que se presentaron en cada uno de los aislamientos, como la formación y distribución de las estructuras de resistencia y, el color, para lo cual se utilizó la tabla de colores The Online Auction Color Chart TM. 2004.

#### ▪ **2.3.1.3. Montaje de placas**

Los montajes de las placas se realizaron con los aislamientos que tenían 10 días de edad, con el fin de obtener una cantidad considerable de conidias y ascosporas (50 conidios por cepa en promedio), las cuales se depositaron sobre un portaobjetos que contenía una gota de solución de azul de algodón al 1% y se cubrió con un cubre

objeto, y se visualizó al microscopio; enfocado a 20X y 40X. Posteriormente, se selló con esmalte transparente. (Gañan et, al 2015). Los aislamientos que no presentaron suficientes cantidades de conidias, se sometieron a estrés utilizando luz constante, choque térmico (24 horas de frío a 4oC y 24 horas de temperatura ambiente 27-30oC), para inducir esporulación; facilitando una mayor cantidad de conidias por cepa y mejor calidad de las placas para las micrografías.

▪ **2.3.1.4. Registros fotográficos**

Las micrografías de las placas se realizaron en el Laboratorio de Microscopía de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, en un microscopio óptico (Zeiss Axio Lab A1), utilizando el objetivo de 20X y 40X, bajo contraste, campo claro y campo oscuro, con el fin de obtener la mayor calidad, resolución, cantidad de ascosporas y esporas de *Glomerella* spp y *Colletotrichum* spp.

▪ **2.3.1.5. Análisis microfotografías**

Las micrografías se analizaron, con el programa Image J, con el cual se determinó, área, largo y ancho de las conidias, para diferenciar los aislamientos de *Colletotrichum* spp.

▪ **2.3.1.6. Análisis de tamaño de conidias**

Para observar si hay diferencia de tamaño en las conidias de los aislamientos, se realizó un DCA para los 59 tratamientos y 50 repeticiones, en el programa estadístico SAS Deployment Wizard 9.4 y se utilizó la prueba de Rango Multiple

## **2.4 Caracterización Molecular**

En la Caracterización Molecular de los aislamientos monoconidiales de *Colletotrichum* spp en aguacate var. Hass, se realizó la multiplicación de cada uno de los aislamientos, para la obtención de ADN. Los aislamientos del estudio se sembraron en medio de cultivo sólido Papa- Dextrosa-Agar (PDA 40 gr/l), los cuales se incubaron a 25°C durante 10 días. Algunos que presentaron crecimiento de Actinomycetes fue necesario su siembra en medio de cultivo líquido Papa-Dextrosa (PD), que consistía en 200

gramos de papa fresca + 20 gramos de dextrosa por litro de agua y el antibiótico Rimfapicina (2 ml/L de medio). De la preparación anterior se dispuso 100 cc del medio de cultivo a erlenmeyers de una capacidad de 250 cc, los cuales se inocularon con cada una de las cepas a limpiar y se llevaron a un horno de hibridación (ProBlot 12S hybridization Oven, Labnet), a una temperatura de 30°C, en agitación constante a 150 rpm, durante 5 días, al cabo de los cuales se colectó el micelio y se procedió a lavarlo en agua destilada estéril, para retirar el medio del micelio y posterior centrifugación durante 10 minutos a 14000 rpm, para extraer excesos de humedad. El micelio extraído se depositó en Tubos Eppendorf de 1,5ml, de los cuales se pesaron 150 mg de cada cepa, necesario para el inicio del proceso de extracción de ADN (Figura 8).

**Figura 8. Crecimiento y recolección de micelio de *Colletotrichum* spp en medio líquido y sólido, para extracción de ADN**



A, B y C Crecimiento y recolección de micelio de *Colletotrichum* spp en medio líquido 5 dds. D, E y F Crecimiento y recolección de micelio de *Colletotrichum* spp en medio a los 10 dds para proceso de extracción de ADN. F. Almacenamiento micelio de *Colletotrichum* spp.

**Fuente:** G.M. Cobo N.; C.A. Hernández V., 2016.

### 2.4.1 Extracción de ADN

Se tomaron 150 mg de micelio fresco y se siguió el protocolo de extracción Dneasy Plant Mini Kit 50 (QIAGEN, 2013). Para efectos de rompimiento de la membrana celular de cada uno de los aislados, estos fueron sometidos a macerado por 3 minutos en un mortero con el Buffer AP1 + 4 µl Rnase A, previamente precalentado a 65°C por un tiempo de 10 minutos; terminado este proceso el producto fue pasado a un tubo Eppendorf, se llevó a un vórtex por unos segundos, se incubó por 10 minutos a 65°C en agitación constante. Pasado este tiempo se agregaron a la muestra 130 µl del Buffer P3, se mezcló por inversión del tubo Eppendorf y se incubó por 5 minutos en hielo, se sometió a centrifugación por 5 minutos a 14000 rpm, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo de centrifugación y se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm, se pasó el filtrado sin tomar el pellet y se colocó en un nuevo tubo eppendorf al cual se le adicionó 1.5 del volumen de buffer AW1 y se mezcló con la ayuda de una micropipeta.

De la mezcla anterior se transfirieron 650 µl a una columna de centrifugación blanca, centrifugándose por 1 min a 8000 rpm y se descartó el líquido, repitiendo el paso con el excedente de la muestra. Terminado este proceso, se adicionaron 500 µl del Buffer AW2 en la columna, se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm y se descartó lo que paso por la columna, adicionando de nuevo otros 500 µl del buffer AW2, centrifugando 2 min a 14000 rpm y se descartó el líquido. Finalmente, se colocó la columna en un nuevo tubo eppendorf, al cual se le adicionó 50 µl del buffer AE, incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente, con posterior centrifugación por 3 min a 10000 rpm, muestra que se identifica como ADN1; este proceso se repite nuevamente en un nuevo tubo, agregando 50 µl del buffer AE, incubándose 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga a 10000 rpm por 4 minutos, esta muestra se identifica como ADN2. Terminado el proceso de extracción se sellan y se almacenan a -20°C.

### 2.4.2 Electroforesis

Para verificar la calidad del ADN de cada una de las muestras procesadas, se realizó electroforesis utilizando un gel de agarosa al 0,8% + 2 µl de Bromuro de Etidio, buffer TAE 1X (Tris Acetato EDTA), el cual fue corrido a 65 V cm<sup>-1</sup> durante 45 minutos. De cada muestra se utilizaron de 5 µl de ADN para este proceso, usando como marcador de peso molecular GeneRuler de 1 Kb, Fermentas.

### 2.4.3 Cuantificación de ADN

Se logró obtener concentraciones de ADN entre 10 a 20 ng/µl, cantidades suficientes para su amplificación por PCR con los marcadores moleculares y la cuantificación de ADN se realizó mediante comparación de concentraciones del bacteriófago *Lambda* a 100, 50 y 20 ng. La visualización se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% + 2 µl de Bromuro de Etidio y la visualización de las imágenes del gel con el Software Gel Doc 2000 (Bio- Rad Laboratories, Inc.).

### 2.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La identificación y amplificación de las muestras de ADN provenientes de cada uno de los aislamientos de cultivos monoconidiales de *Colletotrichum* spp., se realizó teniendo en cuenta la utilización de los primers universales ITS1 e ITS4, este último combinado con los primers CgInt (5'GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG3') específico para *Colletotrichum gloeosporioides* y Calnt2 (5'GGGGAAGCCTCTCGCGG3') específicos para *Colletotrichum acutatum*, respectivamente. Además, con el fin de identificar posibles nuevas especies y determinar la diversidad y complejidad de los aislamientos de *Colletotrichum* spp., se procedió a utilizar la siguiente combinación de primers complementarios: ACT- 512F + ACT-783R, CHS-79F + CHS-345R, GDF + GDR, T1+ T2 y CL1 + CL2A. (Tabla 3).

**Tabla 3: Primers utilizados para análisis moleculares**

Gene	Product	Direction	Name	Primer Sequence (5'–3')	Reference
ITS	Internal transcribed spacer	ITS-1F	Forward	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes & Bruns 1993
		ITS-4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> 1990
		ITS-2	Reverse	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC'	White <i>et al.</i> 1990
CgInt		CgInt	Forward	GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG	White <i>et al.</i> 1990
CaInt2		CaInt2	Forward	GGG GAA GCC TCT CGC GG	White <i>et al.</i> 1990
ACT	Actin	ACT-512F	Forward	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	Carbone & Kohn 1999
		ACT-783R	Reverse	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT	Carbone & Kohn 1999
CHS-1	Chitin synthase	CHS-79F	Forward	TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG	Carbone & Kohn 1999
		CHS-345R	Reverse	TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG	Carbone & Kohn 1999
TUB2	$\beta$ -Tubulin 2	T1	Forward	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigelnik 1997
		T2	Reverse	TAG TGA CCC TTG GCC CAGT TG	O'Donnell & Cigelnik 1997
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GDF	Forward	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	Templeton <i>et al.</i> 1992
		GDR	Reverse	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	Templeton <i>et al.</i> 1992
CAL	Calmodulin	CL1	Forward	GAR TWC AAG GAG GCC TTC TC	O'Donnell <i>et al.</i> 2000
		CL2A	Reverse	TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC	O'Donnell <i>et al.</i> 2000

**Fuente:** Afanador.L.et al 2014

En la preparación del mix para el proceso de PCR, se procedió a utilizar la metodología reportada por Afanador et al., 2014; donde cada reacción estuvo compuesta por las siguientes concentraciones: 1X de Buffer Taq, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5  $\mu$ M para cada primer, 1.5 Mm de  $MgCl_2$ , 0.1U de Taq DNA polimerasa Thermo scientific y DNA a 0,2 ng  $\cdot \mu L^{-1}$ , con la obtención de un volumen final de 25  $\mu$ L por reacción. La amplificación del ADN fue realizada en un Termociclador Labnet Multigene PTC 100 Biorad. Los ciclos fueron determinados en base a los reportes bibliográficos, con modificaciones en la temperatura de alineamiento, que fue necesario estandarizar

realizando gradientes de temperatura, para cada uno de los primers utilizados (Tabla 4 y 5).

**Tabla 4. Ciclos de PCR para muestras de ADN de *Colletotrichum* spp.**

Primer	T° Inicial	Tiempo	Ciclos	T° Desnaturalización	Tiempo
ITS 1F+ITS4	95	4'	35	95	30''
ITS4+CgInt	95	5'	40	95	30''
ITS4+ Calnt2	95	5'	40	95	30''
ACT	95	4'	35	95	30''
CHS -1	95	4'	35	95	30''
TUB2	95	4'	35	95	30''
GADPH	95	4'	35	95	30''
CL1+ CL2	94	2,5'	40	94	30''

Fuente: G.M. Cobo N. y C.A. Hernández. Modificaciones de las temperaturas de alineamiento

**Tabla 5. Referencias bibliográficas para temperaturas de alineamiento, con modificaciones**

Primer	T° alineamiento	Tiempo	T° extensión	Tiempo	T° extensión final	Tiempo	Referencias
ITS 1F+ ITS4	52.5	30''	72	45''	72	7'	Weir <i>et al.</i> , 2012
ITS4+CgInt	62.1	30''	72	1.5'	72	4'	Afanador <i>et al.</i> , 2014
ITS4+ Calnt2	60.5	30''	72	1.5'	72	4'	Afanador <i>et al.</i> , 2014
ACT	59	30''	72	45''	72	7'	Weir <i>et al.</i> , 2012
CHS -1	58	30''	72	45''	72	7'	Weir <i>et al.</i> , 2012
TUB2	55	30''	72	45''	72	7'	Weir <i>et al.</i> , 2012
GADPH	59.6	30''	72	45''	72	7'	Weir <i>et al.</i> , 2012
CL1+CL2	54.1	30''	72	30''	72	15'	Prihastuti, 2009

Las anteriores referencias, fueron la base a tener en cuenta para realizar los ajustes de las temperaturas de alineamiento de cada uno de los primers evaluados con los ADN obtenidos de los aislamientos de *Colletotrichum* spp

### **2.4.5 Secuenciación**

En el proceso de secuenciación, las muestras obtenidas producto de PCR fueron enviadas a Macrogen Corea del Sur, para su secuenciación en dos sentidos (Forward y Reverse). Para este proceso se seleccionaron 82 muestras que fueron clasificadas en función del número de regiones que amplificaron positivo para cada uno de los primers evaluados, tomando en cuenta las que mayores regiones amplificaron. Las muestras se identificaron y empacaron, según las instrucciones impartidas por el laboratorio encargado de hacer el proceso de secuenciación.

### **2.4.6 Análisis bioinformáticos**

Las secuencias fueron editadas utilizando el programa Geneious software versión 10.0.3 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012)", en donde se realizó un alineamiento de cada una de las secuencias Forward y Reverse, con los respectivos primers de cada secuencia. Las secuencias consenso fueron alineadas en el programa Bioedit (Hall, 1999), con un Clusters W de múltiple alineamiento y un número total de 1000 bootstrap; posteriormente una vez obtenidas estas secuencias, se construyeron los árboles filogenéticos, teniendo como base 3 a 4 secuencias, obtenidas mediante un análisis BLAST 2.5.1. (Zhang *et al*, 2000; Morgulis *et al* , 2008) y con porcentajes de cobertura del 99 a 100%. Finalmente, para los análisis filogenéticos y de evolución molecular se realizaron con base a las secuencias evaluadas utilizando el programa Mega versión 6 y 7 (Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007).

## 2.5 Pruebas de Patogenicidad

Con esta prueba se observó y determinó la capacidad patogénica de cada uno de los aislamientos colectados en los diferentes municipios del Valle del Cauca, para ello se establecieron las pruebas de inoculación en frutos en laboratorio, con el fin de producir síntomas de antracnosis sobre frutos sanos, los cuales habían sido cosechados con índice de madurez fisiológica, y de los cuales se emplearon 2 frutos por unidad experimental con tres repeticiones y como testigo dos frutos por aislamiento.

Los 59 aislamientos se sometieron a pruebas de patogenicidad. Los aislados se cultivaron en medio de cultivo PDA a temperatura ambiente (24°C) con luz blanca durante 8 días. Los frutos de aguacate cv Hass con madurez fisiológica seleccionadas para los controles de inoculación y negativos se lavaron con tween 80 en agua corriente por 20 minutos, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y alcohol al 70% por 1 minuto, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y secadas en cabina de flujo laminar.

Se preparó una suspensión conidial  $10^6$  conidios por  $\text{ml}^{-1}$  de cada aislamiento de *Colletotrichum* spp de 8 días de edad, y a cada uno se les adicionó 5 ml de agua destilada estéril. La inoculación se llevó a cabo utilizando el método punción de frutos, realizando unas pequeñas heridas de 2 mm de profundidad sobre el exocarpio, después se aplicó 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión de conidias en cada una de las tres heridas espaciadas dos (2) cm una de otra (Guetsky et al., 2005). Terminada la inoculación, los frutos se sometieron a temperatura ambiente del laboratorio 27-30°C en cámara húmeda con 98% de humedad relativa hasta la observación de los síntomas, que ocurrió a los 7 días. Los controles se inocularon de la misma forma, pero con agua estilada estéril, bajo las mismas condiciones. (Silva-Rojas H. V. & Ávila-Quezada, G. D., 2011).

Los frutos se evaluaron al séptimo día después de la inoculación para medir el desarrollo de las lesiones típicas de la pudrición blanda en el mesocarpio, para lo cual éstos se cortaron longitudinalmente. Los aislamientos de cada especie, de acuerdo con la identificación filogenética, se mantuvieron en cámara húmeda por separado para

evitar la contaminación cruzada. Todas las pruebas se llevaron a cabo tres veces de forma independiente para confirmar la patogenicidad de los aislamientos. El patógeno se reaisló a partir de los frutos inoculados para cumplir con los postulados de Koch (Agrios, 1996). Las identidades de los agentes patógenos se confirmaron utilizando características morfológicas y moleculares. El presente trabajo analizó la intensidad y variabilidad patogénica intra e intraespecífica en función del desarrollo radial superficial de lesiones provocadas por aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Para la caracterización de la patogenicidad, se evaluaron las variables: diámetro superficial de lesiones (DSL), área superficial de lesiones (ASL), grado de madurez de los frutos (GMF), y crecimiento de lesiones, evaluados en etapa de madurez fisiológica.

### **2.5.1 Recolección del material vegetal para pruebas de patogenicidad**

Se obtuvieron de la finca Los Fresnos ubicada en la vereda el Mango, municipio de Piendamó, Cauca (2°46'21.1"N 76°33'27.1"W), frutos sanos de Aguacate (*Persea americana*) var Hass en estado de madurez fisiológica. Se propuso una escala de maduración de los frutos de 0 a 5 (Figura 38). Este grado de madurez se usó como covariable para ajustar los tratamientos.

### **2.5.2 Desinfección de material vegetal**

Los frutos de aguacate var. Hass obtenidos en grado de madurez fisiológica sin tratamiento químico en poscosecha, se lavaron con una solución de agua y Tween 80 durante 10 minutos, seguido por una desinfección de la superficie mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 1 % (5 minutos) y aspersion de etanol al 70% (3 minutos). Posteriormente, los frutos fueron lavados tres (3) veces con agua destilada estéril y secados en cabina de flujo laminar sobre toalla de papel estéril (Gañán, *et al.*, 2015).

### 2.5.3 Preparación del inóculo

La preparación del inóculo, se realizó con cada una de los aislamientos de *Colletotrichum* spp., provenientes de cultivos monoconidiales, incubados en condiciones de oscuridad constante a una temperatura media de 25°C, los cuales fueron cosechados a partir de los 8 días después de siembra (dds) de crecimiento en medio de cultivo PDA con antibiótico (Rifampicina 2 ml/L) en la medida en que fueron madurando. Los aislamientos no esporulados, se sometieron a condiciones de estrés mediante luz continua y/o a refrigeración (4°C), hasta la aparición de las conidias.

En la preparación de las suspensiones conidiales de cada aislamiento; inicialmente se verificó la presencia de conidias típicas en la colonia, se agregaron 5 a 10 ml de una solución de agua destilada estéril con Tween 80 (1 ml/L) y se froto suavemente el micelio humedecido con un asa micológica estéril doblada 90° para desprender las conidias de los conidióforos. Se rescató el lavado de la colonia y se cuantificó la primera suspensión conidial en cámara de Neubauer. Finalmente, las suspensiones para cada cepa fueron ajustadas a una concentración de  $10^6$  conidias por  $\text{ml}^{-1}$ .

Para los aislamientos en que no se encontraron abundantes conidias después de haberlas sometido a condiciones de estrés; se removió el micelio de la superficie de la colonia con un asa micológica estéril en forma de L, con 5 a 10 ml de una solución de agua destilada estéril con Tween 80 (1 ml/L). Las suspensiones iniciales se filtraron para separar el micelio y obtener las conidias, las cuales se suspendieron nuevamente en agua destilada estéril con Tween 80 (1 ml/L) y se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 minutos antes de descartar el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 3 veces. Las suspensiones fueron ajustadas a  $10^6$  conidias por  $\text{ml}^{-1}$  usando la cámara de Neubauer. (Manandhar et al., 1995).

### 2.5.4 Diseño experimental

Para el análisis estadístico de la patogenicidad de los aislamientos de *Colletotrichum* spp., se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Se evaluaron cincuenta y

nueve aislamientos (tratamientos) con tres observaciones por tratamiento y dos (2) frutos por unidad experimental. Se realizó un análisis de varianza propio del diseño experimental y ajuste de medias de tratamientos utilizando como covariable el grado de madurez de los frutos. Por último, se hizo una prueba de rango múltiple de Duncan con un nivel de significancia del 0.05.

### 2.5.5 Inoculación del patógeno

Los frutos se inocularon mediante el método de inoculación por herida (punción) y goteo modificado de (Than, *et al.*, 2008), depositando 10 ml de la suspensión conidial ( $\sim 1 \times 10^6$  conidias /ml) sobre el área de la herida previamente demarcada, realizando tres punciones separadas por  $\sim 2$  cm entre sí sobre el eje longitudinal del fruto y a una profundidad de 2 mm. Los testigos fueron inoculados con la misma metodología y condiciones, usando 10 ml de agua destilada estéril (Figura 9).

**Figura 9: Procesamiento e inoculación de frutos**



A. Secado de aguacates para inoculación. B. Punción de frutos para inoculación C. Inoculación de frutos con cada uno de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. D.. Frutos inoculados se colocan en cámara húmeda por 7 días, para el progreso de la enfermedad.

**Fuente:** G. M. Cobo N., C. Domínguez P., 2016.

Los frutos inoculados se incubaron en cámaras húmedas plásticas de dimensión 21\*10.5\*7 cm y con la ayuda de un termohigrómetro (EXTECH Instruments) se determinó que la humedad relativa fué mayor al 90%, una temperatura ambiente promedio de 25°C, con máximos de 30,7°C y mínimos de 21°C siendo la óptima de desarrollo *in vitro* (24 – 28°C) (Reyes y Morales 2007), y sometidos a regímenes normales de luz durante siete días (Than, *et al.*, 2008).

### **2.5.6 Evaluación de la infección**

Se evaluó diariamente de manera visual la aparición de síntomas y el progreso de la infección hasta los siete (7) días después de la inoculación (ddi). En el séptimo día, se midió el diámetro del daño ocasionado de cada uno de los aislamientos en cada punción. Considerando la lesión como una circunferencia se obtuvo el área en cm<sup>2</sup> con la formula  $A = \pi r^2$ .

Se realizaron montajes de los signos sobre el pericarpio en estereoscopio y microscopio óptico, con el fin de observar la forma, la disposición y las condiciones de acérvulos y demás estructuras características de *Colletotrichum* spp, para cada uno de los 59 aislamientos evaluados.

### **2.5.7 Reaislamiento del patógeno**

Los reaislamientos de frutos inoculados se cultivaron en un medio de cultivo papa, dextrosa y agar (PDA) y las características morfológicas de la colonia se compararon con el cultivo inicialmente inoculado. (Gañán, *et al.*, 2015). Además, se comparó la morfología de las conidias obtenidas sobre el pericarpio de los frutos inoculados (en caso de encontrarse) o de los aislamientos obtenidos en PDA con las del cultivo inicial. En total se evaluaron los 59 aislamientos del estudio.

## **2.6 Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Colletotrichum* spp**

Para la evaluación *in vitro* de los productos de síntesis química para el control *Colletotrichum* spp., fue necesario evaluar cada uno de los 59 aislamientos, donde se analizaron las variables: crecimiento micelial libre (CML), que está representado por el crecimiento de cada uno de los aislamientos control en su medio de cultivo PDA y el crecimiento micelial influenciado (CMI), que corresponde a el sobre el medio de cultivo PDA interactuando con cada uno de los productos de síntesis química; crecimiento de cada uno de los aislamientos más el indicador: inhibición de crecimiento micelial (%IM), donde se midió la variación en susceptibilidad de cada uno de los aislamientos a la aplicación de diferentes tratamientos para el control *in vitro* con productos de síntesis química, donde se evaluó el control del patógeno. (Morales Garcia et al 2009).

Para la realización de esta evaluación por cada uno de los aislamientos y cada producto, se emplearon 3 repeticiones y 1 testigo, los cuales se evaluaban cada 24 horas, donde se medía el diámetro de crecimiento, durante 7 días, al cabo del cual se procedió al montaje de placas de 6 aislamientos escogidos al azar, para todos los tratamientos, con lo que se pretendía observar los cambios morfológicos de los aislados derivados del uso de cada uno de los productos.

### **2.6.1 Productos utilizados**

Para las pruebas de susceptibilidad de los aislamientos al control químico se utilizaron 6 productos de síntesis química en base a dosis por área disponibles en el mercado con registro ICA para la producción de aguacate (Tabla 7). Para aquellos productos que no se registraba en la ficha técnica dosis por área, se relacionó un volumen final de 600 litros de producto preparado por hectárea, para cultivos en producción.

El inhibidor de la biosíntesis del ergosterol es un componente lipídico de la membrana celular, sobre la cual operan la mayoría de los antimicóticos o antifúngicos como los

azoles (triazoles e imidazoles), con la capacidad de inhibir el desarrollo, alterando la viabilidad o supervivencia.

Las estrobirulinas, inhiben la respiración mitocondrial del hongo, afectando la mitosis o división celular, conocidos como DMI's (Dimethylation Inhibitors), como los Tebuconazole, fenbuconazole, propiconazole, tetraconazole y metaconazole. (Gaspar, L.F., 2017).

### **2.6.2 Preparación de fungicidas en agar PDA.**

Los productos evaluados (Tabla 6), se prepararon disolviendo el producto en cada medio de cultivo (PDA), el cual se preparó por componentes, utilizando para cada litro: 200 gramos de papa (*Solanum tuberosum* cv. Parda pastusa), 16 gramos de glucosa monohidratada extra pura marca Honeywell, 18 gramos de agar bacteriológico marca Oxoid, preparados en frascos schott. Al medio ya estéril y a temperatura de 45°C se adicionó la dosis del producto para evitar inactivar los componentes del fungicida, se homogenizó en una plancha magnética por 3 minutos y se procedió a servir 20 cc de la mezcla en cada caja de Petri de 9 cm de diámetro, empleando una bomba de precisión Scott. Los productos evaluados se usaron según la dosis comercial recomendada para cada uno. Para el testigo se adicionó agua destilada estéril.

En la preparación de los productos para el control en PDA, se calculó la cantidad necesaria de fungicida según: la dosis por hectárea recomendada por la casa comercial (Tabla 6), el área de las cajas Petri (63,62 cm<sup>2</sup> c/u), el volumen de medio usado por caja (20ml) y el número de cajas requeridas para cada producto (177), y en base a estos datos se realizaron las conversiones respectivas.

**Tabla 6. Descripción de productos usados para evaluar el control *in vitro* de aislamientos de *Colletotrichum* spp.**

<b>Ingrediente Activo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Grupo Químico</b>	<b>Modo de Acción</b>	<b>Mecanismo de Acción</b>	<b>Dosis Recomendada</b>
Tebuconazole + Prochloraz	133 g/L	Triazol	Sistémico	Inhibidor de biosíntesis del ergosterol, interfiere en formación de membranas celulares. (Registro Nacional ICA No. 442).	0.54 L/Ha
	267 g/L	Imidazol	Translaminar		
Azoxystrobin + Tebuconazole	120 g/L	Estrobilurina	Sistémico Translaminar	Interfiere sobre la respiración mitocondrial. Inhibidor de biosíntesis de ergosterol. (Registro ICA No. 904)	1 L/Ha para severidad mayor del 2,5%
	200 g/L	Triazol	Sistémico		
Prochloraz	450 g/L	Imidazol	Translaminar	Inhibidor de la dimetilación del esteroles en la ruta de la biosíntesis del ergosterol. (Registro Nacional ICA No. 1169).	1 cc/L
Sulfato de cobre pentahidratado	60 g/L	Compuestos de cobre	Contacto	Sustituye metales esenciales para la vida de patógenos en cantidades infinitesimales produciendo intoxicación y la muerte. (RSCO-FUNG-0357-321-013-021).	1.5L/Ha
Myclobutanil	400 g/Kg	Triazol	Sistémico.	Actúa por inhibición de la síntesis de ergosterol. (Registro Nacional ICA No. 2697).	80 g/Ha
Azoxystrobin + Flutriafol	125 g/L	Estrobilurina	Sistémico	Inhibidor de respiración mitocondrial y síntesis del ergosterol. (Registro Nacional ICA No. 995).	0.5 L/Ha
	125 g/L	Triazol	Sistémico		

**Fuente:** FRAC Code List ,2017.

### 2.6.3 Siembra de aislamientos en medio de cultivo con fungicida

La siembra se realizó en cabina de flujo laminar mediante el método de bloques de medio de cultivo con el crecimiento de cada uno de los 59 aislamientos evaluados, con 8 días de incubación, para lo cual se hizo uso de un sacabocados estéril de diámetro de 0.5 cm, los cuales se colocaron en el centro de las cajas con y sin producto y se incubaron durante 7 días a temperatura ambiente (24 – 30°C), realizándole seguimiento diario (Alfonso y Sandoval 2008). (Figura 10).

**Figura 10: Siembra de aislamientos en medio tratado con fungicida**



**A.** Esterilización sacabocados para corte de inóculo. **B.** Inoculación de aislamientos en cada uno de los fungicidas a evaluar

**Fuente:** G. M. Cobo N., C. Dominguez P., 2016.

### 2.6.4 Evaluación de la inhibición micelial.

La velocidad del crecimiento de los hongos con y sin fungicida se realizó a los 7 días después de la siembra, para ello se marcó el área a medir en forma de cruz, midiendo el diámetro en milímetros de cada uno de los dos trazos que atravesaban la caja.

La inhibición del crecimiento micelial de los diferentes aislamientos (59) se determinó en porcentaje (%) con base en la relación de longitud de crecimiento radial del hongo sin fungicida y el hongo con fungicida mediante la siguiente formula:  $\%IM = \frac{CML - CMI}{CML} \times 100$ .

Donde **%IM**: porcentaje de inhibición de crecimiento micelial, **CML**: crecimiento micelial libre y **CMI**: crecimiento micelial influenciado. (Alfonso y Sandoval 2008)

### **2.6.5 Diseño experimental de evaluación del control.**

Para el análisis estadístico de la inhibición micelial producida por los diferentes fungicidas, se usó un diseño completamente al azar (DCA) comprendido por trescientos cincuenta y cuatro (354) tratamientos (59 por cada producto), compuestos de tres (3) repeticiones cada uno y una prueba de rango múltiple de Duncan. En la evaluación *in vitro* de moléculas de síntesis química y biológica, se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA), donde se evaluaron 6 repeticiones por aislamiento de cada una de las cepas encontradas y 6 moléculas de síntesis química, en el control de *Colletotrichum* spp.

### **2.6.6 Evaluación estructural del efecto de los fungicidas.**

La evaluación del efecto de los fungicidas, se realizó en una muestra aleatoria del 10% del total de aislamientos. Para los 6 productos, se determinó de manera visual los cambios microscópicos de las estructuras somáticas y reproductivas conseguidos al séptimo día de incubación en relación al testigo.

### **2.6.7 Pruebas de sensibilidad a moléculas de síntesis química**

En la evaluación *in vitro* de moléculas de síntesis química y biológica, se evaluaron los aislamientos de cada una de las cepas encontradas, con 6 productos de síntesis química, en el control de *Colletotrichum* spp. Se evaluó el crecimiento radial del patógeno por 14 días, en medio PDA. Los mejores tratamientos, se recomendará como posible estrategia de evaluación de control en campo, en futuros trabajos de investigación.



## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Elaboración del cepario: codificación, aislamiento y conservación de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Se realizó un cepario de 59 aislamientos de *Colletotrichum* spp, procedentes de frutos de aguacate var. Hass, obtenido en diferentes municipios del Valle del Cauca (Tabla 3). Todas las aislamientos del patógeno crecieron bien en medio de cultivo PDA con el antibiótico Rifampicina, cuyo crecimiento fue diferencial en el medio de cultivo, ya que algunos fueron relativamente lentos con un crecimiento en el medio del 30-40%, y otros cubrieron el 100% del total de la caja a los 10 días.

#### 3.1.1 Cultivos monospóricos

Del cepario obtenido se aislaron y conservaron 59 aislamientos, de estos se obtuvieron cultivos monospóricos, los cuales se usaron para la caracterización morfológica, molecular, pruebas de patogenicidad y control *in vitro* (Tabla 7).

**Tabla 7 Aislamientos obtenidos en los diferentes municipios del Valle del Cauca.**

Aislamiento	Municipio	Finca	Código
1	El Dovio	Querella	DQ2
2	Versalles	El Porvenir	VEP3
3	Sevilla	Los Nogales	SLM1
4	Argelia	Concentración Rural Agrícola	AC1-1
5	Argelia	Concentración Rural Agrícola	AC3-2
6	Caicedonia	Santa Helena	CSE2
7	Caicedonia	Santa Helena	CSH3
8	La Unión	Villa Juliana	LUVJ3-2
9	Caicedonia	El Chaquiro	CCh7
10	La Unión	Villa Juliana	LUVJB-1
11	Restrepo	Buen vivir	REB2

12	Versalles	El Porvenir	VEP1
13	Sevilla	El Chanel	SECh1
14	El Cairo	La Aurora	ECA1
15	Caicedonia	El Chaquiro	CCh6
16	Roldanillo	Las Brumas	RB1
17	Bolívar	La Plazuela	BP3
18	Yotoco	El Rubí	YER1
19	Sevilla	Los Nogales	SMN1
20	Argelia	La Palmera	APE1
21	Roldanillo	Las Brumas	RB4
22	El Cairo	La Aurora	ECA2-1
23	Argelia	El Recreo	AR1
24	El Cairo	La Aurora	ECA2
25	Toro	La Esperanza	TE1
26	Versalles	Tijuana	VT2-2
27	Palmira		P2
28	Versalles	Tijuana	VT2-1
29	La Unión	Villa Juliana	LUVJ3-1
30	Toro	La Esperanza	TE2-1
31	Versalles	Tijuana	VT5
32	Palmira		P2-1
33	La Unión	Villa Juliana	LUVJ3-3
34	Roldanillo	Arcansas	Rar2
35	Versalles	El Porvenir	VEP2
36	Versalles	Tijuana	VT1-2
37	La Unión	Villa Juliana	LUVJ4
38	Sevilla	La María	Coll2B-3
39	Roldanillo	Arcansas	Rar1
40	Bolívar	San Miguel	BSM
41	Toro	Villa Liceth	TVL5
42	Argelia	Concentración Rural Agrícola	AC3-4
43	Yotoco	Villa Garzón	YV6
44	Toro	La Esperanza	TE2-2
45	Argelia	Concentración Rural Agrícola	AC1-2
46	Versalles	Tijuana	VT1-1
47	Caicedonia	El Chaquiro	CChB
48	Palmira		P1C
49	Toro	Villa Liceth	TVL4
50	Caicedonia	La Isla	CLI4
51	Argelia	Concentración Rural Agrícola	AC1-3
52	El Dovio	La Querella	DQ2-1

<b>53</b>	Argelia	Concentración Rural Agrícola	AC3-1
<b>54</b>	Bolívar	La Plazuela	BP2
<b>55</b>	Argelia	Concentración Rural Agrícola	AC4
<b>56</b>	Versalles	Tijuana	VT2-2
<b>57</b>	El Dovio	El Diamante	DED-1
<b>58</b>	La Unión	Villa Juliana	LUVJ3-2
<b>59</b>	La Unión	Villa Juliana	LUVJC

**Fuente:** G.M. Cobo N., 2016.

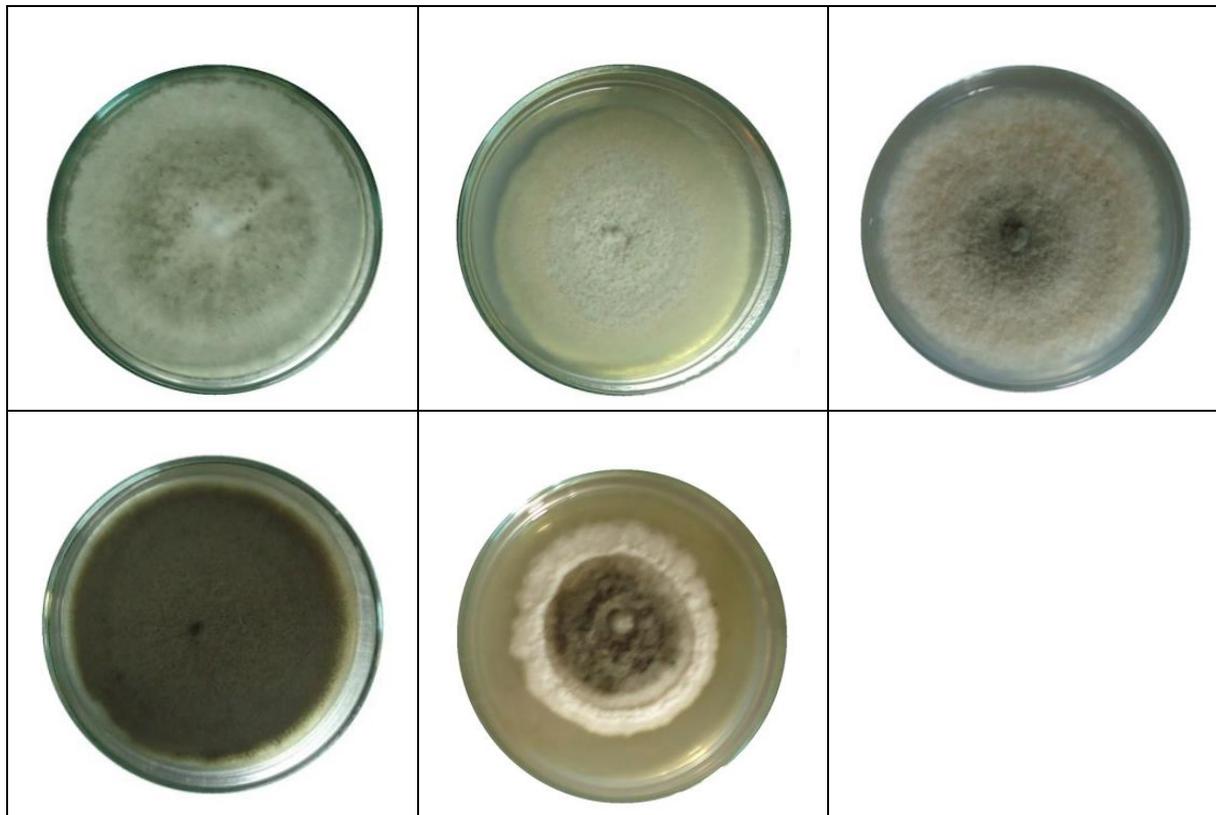
## **3.2 Caracterización morfológica de *Colletotrichum* spp en aguacate *Persea americana* var. Hass**

### **3.2.1 Aislamientos.**

De los 59 aislamientos monospóricos obtenidos, se utilizaron para realizar evaluaciones posteriores, principalmente, para observar características de crecimiento a nivel macroscópico como también para el montaje de placas que se usaron para caracterizar morfológicamente los aislamientos a nivel microscópico.

### **3.2.2 Clasificación de colonias.**

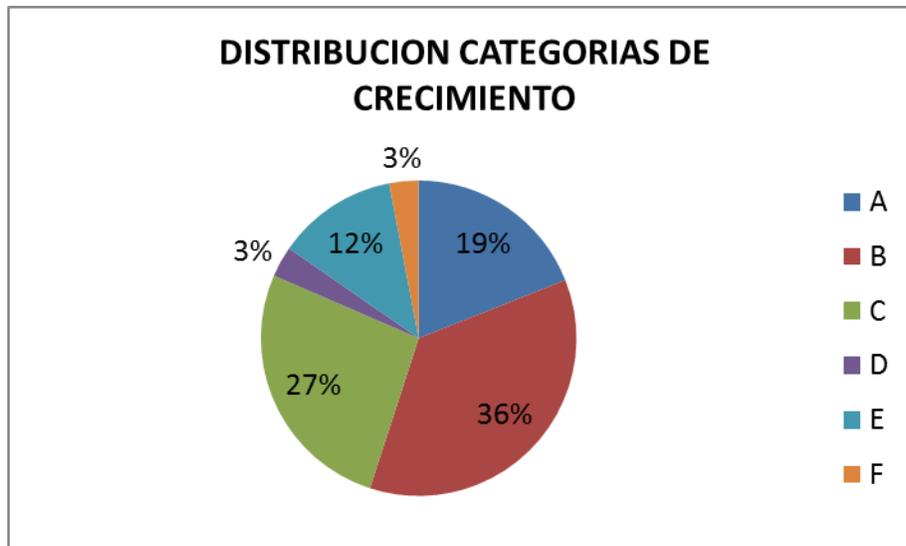
Las características observadas a nivel macro de los 59 aislamientos de *Colletotrichum* spp., fueron clasificadas en seis categorías, basándose en la formación y distribución de estructuras reproductivas, color y tipo de micelio, después de diez días de incubación. (Figura 11). Las colonias se distribuyeron cada una en diferentes proporciones como se observa en la (Figura 12).

**Figura 11: Características macro observadas en los aislamientos de *Colletotrichum* spp.**

**A** colonias con micelio esponjoso de color gris claro, con presencia de estructuras de resistencia de color negro; **B** colonias con micelio esponjoso, rastreo de color blanco-gris sin presencia de estructuras de resistencia; **C** colonias con crecimiento en forma de anillos concéntricos, abundante formación de acérvulos de color salmón, micelio oscuro en el centro y blanco-gris en los extremos; **D** colonias con micelio esponjoso, rastreo de color gris oscuro, sin presencia de estructuras de resistencia; **E** colonias con micelio esponjoso, aéreo, de color gris-blanco sin presencia de estructuras de resistencia; **F** colonias con micelio algodonoso de color blanco, sin formación de estructuras de resistencia. (Afanador *et al.*, 2014).

**Fuente:** G. M. Cobo N., D.F. Mosquera P., 2016

**Figura 12 . Distribución categorías de crecimiento de *Colletotrichum* spp**

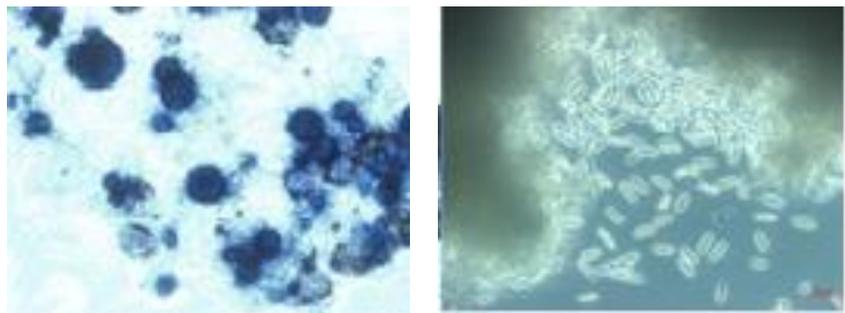


En la figura 15, se presenta la distribución de las seis categorías de crecimiento. Los aislamientos de la categoría **A**. representaron el 19%, **B**. representó la mayor cantidad de aislamientos con un 36%, **C**. representado por un 27%, **D** representado en un 3%, **E**. representó un 12% y **F** representó el 3%.

**Fuente:** G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M. García D., 2016

Algunos aislamientos, formaron estructuras como acérvulos y ascas, después de los diez días de incubación, muchos de ellos se formaron en respuesta a algún tipo de estrés, como estrés físico provocado por los cortes que se realizaban sobre el micelio en el agar con sacabocados o con asas. (Figura 13).

**Figura 13. Estructuras observadas en los aislamientos de *Colletotrichum* spp.**



**A.** Ascas y Ascosporas; **B.** Acervulos; **C.** Conidios

**Fuente:** G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P., 2016

### 3.2.3 Crecimiento de colonias

Se encontró diferencia altamente significativa para los 59 aislamientos de *Colletotrichum* spp evaluados en relación al crecimiento de las colonias (mm), largo ( $\mu\text{m}$ ), ancho ( $\mu\text{m}$ ) y área ( $\mu\text{m}^2$ ) (Tablas 8, 9, 10, 11, 12 y 13). Los aislamientos presentaron crecimientos que oscilaron entre 42,5 mm y 17,5 mm, con un crecimiento promedio de 35,49 mm (Tabla 8).

**Tabla 8. Cuadrados medios para Morfología de *Colletotrichum* spp.**

Variable	Cuadrado medio
Crecimiento de colonias (mm)	169,81**
Largo ( $\mu\text{m}$ )	369,33**
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	32,62**
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	21275.57**

\* Nivel de significancia al 5%

\*\* Nivel de significancia al 1%

Se encontró diferencia altamente significativa entre los 59 aislamientos (Tabla 9). Los aislamientos presentaron crecimientos que oscilaron entre 42,5 mm y 17,5 mm, con un crecimiento promedio de 30,59 mm. (Figura 14).

**Tabla 9. Crecimiento radial (mm) de *Colletotrichum* spp *in vitro* a los diez (10) días después de incubación (ddi).**

GRUPO DUNCAN	CEPAS	MIN	MAX	PROMEDIO
<b>A</b>	23, 2, 4, 18, 20, 41, 22, 24, 5, 9, 21, 1, 6, 42, 39, 33, 45,55, 15, 19, 40, 52, 10, 16, 59, 48, 37, 47,49, 25, 11, 7, 13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17	34,5	<b>42.5</b>	38,72
<b>A-B</b>	23, 2, 4, 18, 20, 41, 22, 24, 5, 9, 21, 1, 6, 42, 39, 33, 45,55, 15, 19, 40, 52, 10, 16, 59, 48, 37, 47,49, 25, 11, 7, 13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,18	34,5	39,75	35,57
<b>B</b>	45,55, 15, 19, 40, 52, 10, 16, 59, 48, 37, 47,49, 25, 11, 7, 13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28	32,5	39,75	36,8
<b>C</b>	15, 19, 40, 52, 10, 16, 59, 48, 37, 47,49, 25, 11, 7, 13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28, 53	31	39	36,6

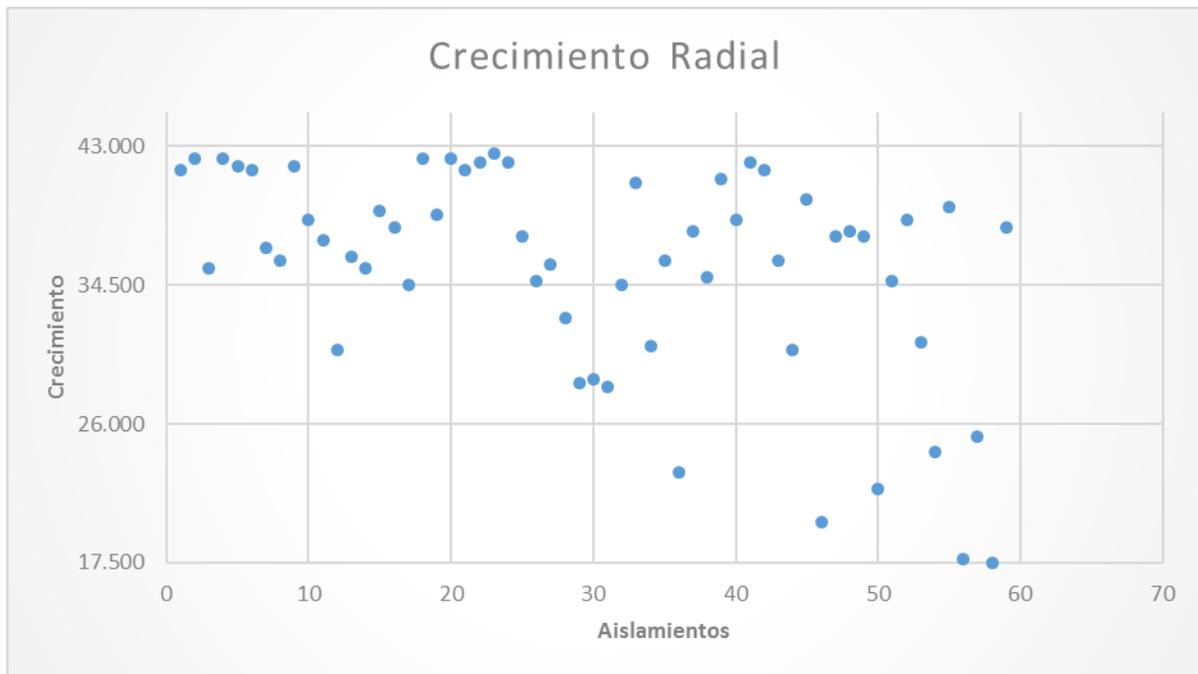
<b>C-B</b>	15, 19, 40, 52, 10, 16, 59, 48, 37, 47,49, 25, 11, 7, 13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28	32,5	39	36,4
<b>D</b>	19, 40, 52, 10, 16, 59, 48, 37, 47,49, 25, 11, 7, 13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28, 53, 34	30,75	38,75	36,11
<b>D-E</b>	23, 2, 4, 18, 20, 41, 22, 24, 5, 9, 21, 1, 6, 42, 39, 33, 45,55, 15, 19, 40, 52, 10, 16, 59, 48, 37, 47,49, 25, 11, 7, 13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28, 53, 34	30,75	38,5	36
<b>E</b>	40, 52, 10, 16, 59, 48, 37, 47,49, 25, 11, 7, 13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28, 53, 34, 12, 44	30,5	38,5	35,63
<b>E-F</b>	13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28, 53, 34, 12, 44	30,5	36,25	34,1
<b>F</b>	13, 8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28, 53, 34, 12, 44, 30, 29	28,5	36,25	19,32
<b>F-G</b>	8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28, 53, 34, 12, 44, 30, 29	28,5	36	34,75
<b>G</b>	8, 35, 43, 27, 14, 3,38, 26, 51, 32,17, 28, 53, 34, 12, 44, 30, 29, 31	28,25	36	33,11
<b>G-H</b>	28, 53, 34, 12, 44, 30, 29, 31	28,25	32,5	30,09
<b>H</b>	28, 53, 34, 12, 44, 30, 29, 31,57	25,25	32,5	29,55
<b>H-I</b>	53, 34, 12, 44, 30, 29, 31,57	25,25	31	29,19
<b>I</b>	53, 34, 12, 44, 30, 29, 31,57,54	24,25	31	28,64
<b>I-J</b>	30, 29, 31, 57, 54	24,25	28,75	27
<b>J</b>	30, 29, 31, 57, 54, 36, 50	22	28,75	25,71
<b>J-K</b>	30, 29, 31, 57, 54, 36, 50	20	25,25	23,63
<b>K</b>	57, 54, 36, 50	20	25,25	22,9
<b>K-L</b>	54, 36, 50, 46	20	24,25	22,31
<b>L</b>	54, 36, 50, 46, 56, 58	<b>17,5</b>	23	20,75
<b>Σ</b>		599,5	700	672,88
<b>Promedio</b>		27.25	31,82	30,59

Fuente: G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M. García D., 2016

En el crecimiento radial, los aislamientos para facilidad de clasificación se agruparon El primer grupo, con un crecimiento entre 17,5 y 26 mm., en el cual se ubicaron los aislamientos: 36, 46, 50, 54, 56, 57 y 58. Un segundo grupo, con crecimiento entre 26 y 34,5, en el cual se ubicaron los aislamientos 12, 17, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 44 y 53.

Y un tercer grupo con los aislamientos de mayor crecimiento, el cual fué superior a 34,5 mm, con los aislamientos 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14,15,16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 33, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 55 y 59.

**Figura 14. Distribución de de los aislamientos según el Crecimiento radial (mm) de *Colletotrichum* spp**



Distribución de de los aislamientos según el Crecimiento radial (mm) de *Colletotrichum* spp *in vitro* a los diez (10) días después de incubación (ddi).

El largo de las conidias mostró diferencias altamente significativas entre los 59 aislamientos (Tabla 8). Los aislamientos presentaron crecimientos que oscilaron entre **22,68**  $\mu\text{m}$  y **10,27**  $\mu\text{m}$ , con un crecimiento promedio de 16,36  $\mu\text{m}$ . (Tabla 10, Figura 15).

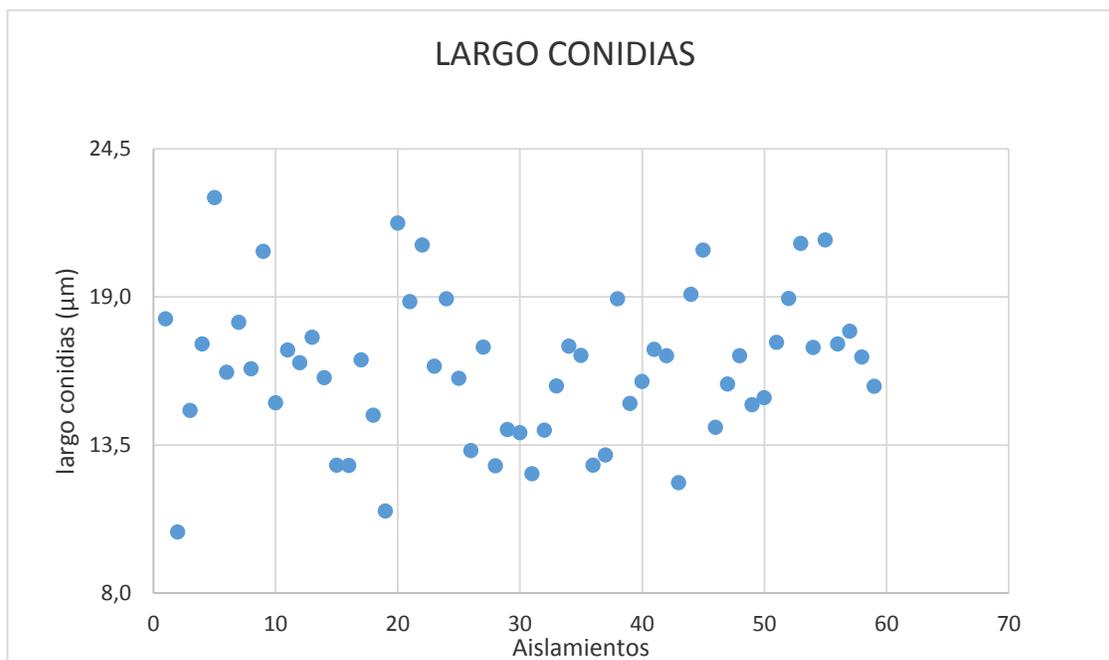
Tabla 10. Tamaño en  $\mu\text{m}$  de conidias de *Colletotrichum* spp Largo ( $\mu\text{m}$ )

GRUPO DUNCAN	CEPAS	MIN	MAX	PROMEDIO
A	5	22,68	<b>22,68</b>	22,68
B	20, 55, 53, 22	20,92	21,74	21,19
B-C	55, 53, 22	20,92	21,11	21,01
C	55, 53, 22, 45,9	20,68	21,11	22,89
D	44, 52,24, 38, 21, 1	18,18	19,1	18,81
D-E	52,24, 38, 21, 1	18,18	18,93	18,76
E	52,24, 38, 21, 1, 7	18,05	18,93	18,64
E-F	1, 7,	18,05	18,18	18,11
F	1, 7, 57, 13, 51, 56, 4, 34	17,17	18,18	17,55
F-G	7, 57, 13, 51, 56, 4, 34	17,17	18,05	17,47
G	7, 57, 13, 51, 56, 4, 34, 27, 54, 41, 11	17,03	18,05	17,33
G-H	57, 13, 51, 56, 4, 34, 27, 54, 41, 11,	17,16	17,72	17,26
H	57, 13, 51, 56, 4, 34, 27, 54, 41, 11, 35, 48, 42, 58, 17	16,65	17,72	17,09
H-I	13, 51, 56, 4, 34, 27, 54, 41, 11, 35, 48, 42, 58, 17	16,66	17,5	17,05
I	13, 51, 56, 4, 34, 27, 54, 41, 11, 35, 48, 42, 58, 17, 12	16,55	17,5	17,02
I-J	51, 56, 4, 34, 27, 54, 41, 11, 35, 48, 42, 58, 17, 12	16,55	17,31	17,01
J	51, 56, 4, 34, 27, 54, 41, 11, 35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8	16,32	17,25	17,47
J-K	51, 56, 4, 34, 27, 54, 41, 11, 35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8	16,32	17,25	16,87
K	56, 4, 34, 27, 54, 41, 11, 35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8, 6	16,19	17,05	16,84
K-L	41, 11, 35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8, 6	16,19	17,05	16,71
L	41, 11, 35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8, 6, 14	16	17,05	16,63
L-M	11, 35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8, 6, 14	16	17,02	16,58
M	35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8, 6, 14, 25	15,97	17,02	16,53
M-N	35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8, 6, 14, 25	15,97	16,82	16,49
N	35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8, 6, 14, 25, 40, 47	15,76	16,82	16,38
N-M-L-K	35, 48, 42, 58, 17, 12, 23, 8, 6	16,17	16,82	16,6
N-O	17, 12, 23, 8, 6, 14, 25, 40, 47	15,76	16,65	16,18
P-Q	14, 25, 40, 47, 33, 59, 50	15	16	15,74
Q	14, 25, 40, 47, 33, 59, 50, 10, 39, 49	15	16	15,53
R	47, 33, 59, 50, 10, 39, 49, 3	14,79	15,77	15,28
R-S	50, 10, 39, 49, 3	14,79	15,25	15,03
S	50, 10, 39, 49, 3, 18	14,61	15,25	14,96
S-T	10, 39, 49, 3, 18	14,61	15,06	14,67
T	10, 39, 49, 3, 18, 46, 29, 32	14,05	15,06	14,6
T-U	3, 18, 46, 29, 32	14,05	14,79	14,33
U	3, 18, 46, 29, 32, 30	13,95	14,79	14,27
U-V	46, 29, 32, 30	13,95	14,15	14,05

<b>V</b>	46, 29, 32, 30, 26	13,29	14,15	13,9
<b>V-W</b>	29, 32, 30, 26	13,29	14,07	13,84
<b>W</b>	29, 32, 30, 26, 37	13,13	14,07	13,7
<b>X</b>	26, 37, 15, 16,28, 36, 31	12,43	13,28	12,8
<b>X-Y</b>	15, 16,28, 36, 31	12,43	12,75	12,64
<b>Y</b>	15, 16,28, 36, 31, 43	12,43	12,75	10,88
<b>Z</b>	19, 2	<b>10,27</b>	11,04	10,65
$\Sigma$		701,32	734,84	720,02
<b>PROMEDIO</b>		<b>15,94</b>	<b>16,7</b>	<b>16,36</b>

Fuente: G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M. García D., 2016

Figura 15. Largo de conidias de *Colletotrichum* spp, *in vitro* a los diez (10) días después de incubación (ddi).



Fuente: G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M. García D., 2016

Para facilidad de clasificación los aislamientos se agruparon. El primer grupo, con un largo entre 8 y 13,5 µm., en el cual se ubicaron los aislamientos: 2, 15, 16, 19, 26, 28, 31, 36, 37 y 43.

Un segundo grupo, con largo entre 13,5 y 19, en el cual se ubicaron los aislamientos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11,12, 13, 14, 17, 18, 21, 23, 24,25, 27, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 38, 39,40, 41, 42, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 56, 57, 58, y 59.

Y un tercer grupo con los aislamientos de mayor largo, comprendido entre 19 y 24,5  $\mu\text{m}$ , con los aislamientos 5, 9, 20, 22, 44, 45, 53 y 55.

El ancho de las conidias presento diferencia altamente significativa entre los 59 aislamientos (Tabla 8). Los aislamientos presentaron crecimientos que oscilaron entre 7,7939  $\mu\text{m}$  y 3,7075  $\mu\text{m}$ , con un crecimiento promedio de 5,3976  $\mu\text{m}$  (Tabla 11).

**Tabla 11. Tamaño en  $\mu\text{m}$  de conidias de *Colletotrichum* spp Ancho ( $\mu\text{m}$ ).**

GRUPO DUNCAN	CEPAS	MIN	MAX	PROMEDIO
A	5	7,7939	<b>7,7939</b>	7,7939
B	21 ,4	7,0151	7,0608	7,0380
C	7, 45	6,2832	6,5207	6,4020
C-D	45	6,2832	6,2832	6,2832
D	45,12,29,13,11	6,0395	6,2832	6,1455
D-E	12,29,13	6,0395	6,1465	6,1111
E	12,29,13,11, 16,9	5,9339	6,2087	6,0549
E-F	29, 13,11, 16,9	5,9339	6,1465	6,0242
F	29, 13,11, 16, 9, 15, 14, 20, 54	5,8733	6,1465	5,9643
F-G	13,11, 16, 9, 15, 14, 20, 54	5,8733	6,0498	5,2813
G	29, 13,11, 16, 9, 15, 14, 20, 54, 24, 38, 6	5,7697	6,0498	5,9019
G-H	16, 9, 15, 14, 20, 54, 24, 38, 6	5,7697	5,9512	5,8702
H	16, 9, 15, 14, 20, 54, 24, 38, 6, 44, 8, 35	5,7165	5,9512	5,8349
H-I	15, 14, 20, 54, 24, 38, 6, 44, 8, 35	5,7165	5,9099	5,8135
I	15, 14, 20, 54, 24, 38, 6, 44, 8, 35	5,7165	5,9099	5,8135
I-J	20, 54, 24, 38, 6, 44, 8, 35	5,7165	5,8811	5,7914
J	20, 54, 24, 38, 6, 44, 8, 35, 22	5,5982	5,8811	5,7699
J-K	54, 24, 38, 6, 44, 8, 35, 22	5,5982	5,8733	5,7512
K	54, 24, 38, 6, 44, 8, 35, 22,10	5,5825	5,8733	5,7367
K-L	24, 38, 6, 44, 8, 35, 22,10	5,5825	5,8199	5,7054
L	24, 38, 6, 44, 8, 35, 22,10, 4, 52	5,5300	5,8199	5,6845
L-M	38, 6, 44, 8, 35, 22,10, 4, 52	5,5300	5,7996	5,6690

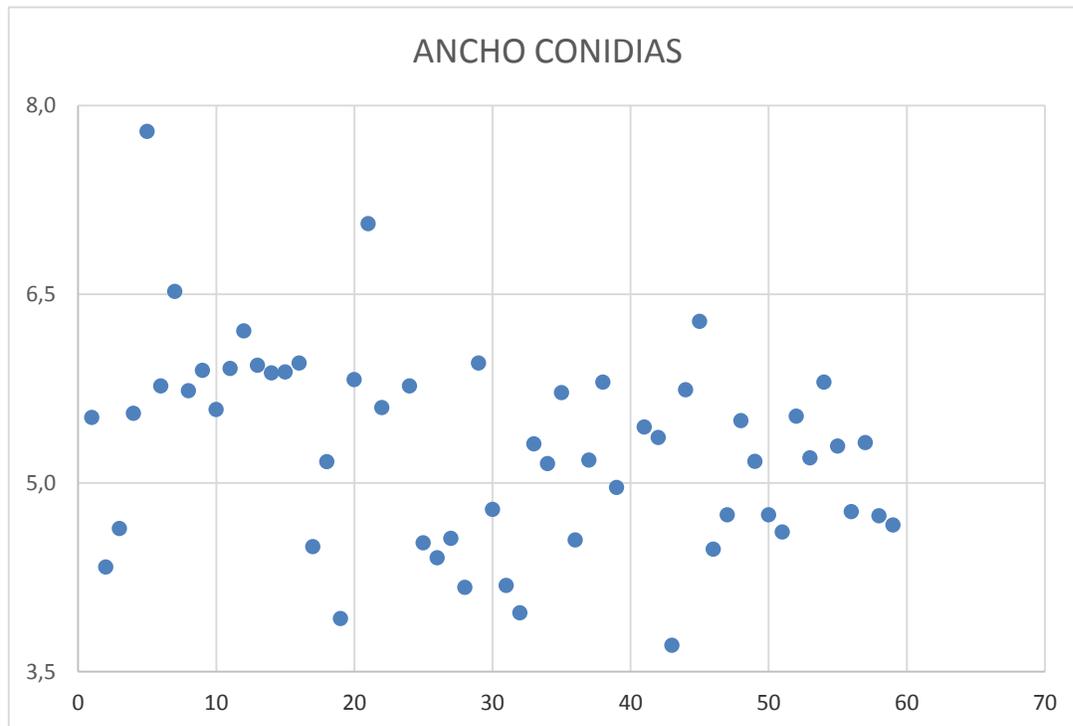
M	38, 6, 44, 8, 35, 22,10, 4, 52	5,5191	5,7996	5,6541
M-N	6, 44, 8, 35, 22,10, 4, 52, 1	5,5191	5,5191	5,6378
N	6, 44, 8, 35, 22,10, 4, 52, 1, 48	5,4939	5,7697	5,6235
N-O	44, 8, 35, 22,10, 4, 52, 1, 48	5,4939	5,7391	5,6072
O	44, 8, 35, 22,10, 4, 52, 1, 48, 41	5,4451	5,7391	5,5910
O-P	22,10, 4, 52, 1, 48, 41	5,4451	5,5982	5,5318
P	22,10, 4,52, 1, 48, 41	5,3615	5,5982	5,5105
P-Q	22,10, 4,52, 1, 48, 41	5,3615	5,5982	5,5462
Q	22,10, 4,52, 1, 48, 41, 42, 57, 33	5,3101	5,5982	5,4715
Q-R	22,10, 4,52, 1, 48, 41, 42, 57, 33	5,3101	5,4451	5,4715
R	10, 4, 52, 1, 48, 41, 42, 57, 33, 55	5,2918	5,5825	5,4409
R-S	41, 42, 57,33, 55	5,2918	5,4451	5,3459
S	41, 42, 57,33, 55, 53, 37, 49, 18, 34	5,1530	5,4451	5,2602
S-T	53, 37, 49, 18, 34	5,1530	5,1995	5,1745
T	53, 37, 49, 18, 34, 39	4,9631	5,1995	5,1392
U	39, 30, 56, 47, 50, 58	4,7378	4,9631	4,7923
U-V	39, 30, 56, 47, 50, 58	4,7378	4,9631	4,7435
V	30, 56, 47, 50, 58, 59, 3, 51, 27, 36, 25, 18	4,4929	4,7895	4,6519
V-W	51,27, 36, 25,17	4,4929	4,6085	4,6262
W	47, 50, 58, 59, 3, 51, 27, 36, 25, 17, 46	4,4720	4,7468	4,6122
W-X	59, 3, 51, 27, 36, 25, 17, 46	4,4720	4,6653	4,5630
X	59, 3, 51, 27, 36, 25, 17, 46, 26	4,4043	4,6653	4,5453
XY	51, 27, 36, 25, 17, 46, 26	4,4043	4,6085	4,5149
Y	51, 27, 36, 25, 17, 46, 26, 2	4,3308	4,6085	4,4919
Y-Z	26, 2	4,3308	4,4043	4,3675
Z	26, 2, 31, 28	4,1697	4,4043	4,2724
Z-A	31, 28	4,1697	4,1846	4,1772
A	31, 28, 32, 19	3,9221	4,1846	4,0606
A-B	31, 28, 32, 29	3,9662	3,9221	3,9442
B	32, 19,43	<b>3,7075</b>	3,9662	3,8652
$\Sigma$		275,8185	286,3209	280,6746
<b>PROMEDIOS</b>		5,3042	5,5061	<b>5,3976</b>

Fuente: G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M. García D., 2016

Los aislamientos para facilidad de clasificación se agruparon en tres grupos. El primer grupo, con un ancho entre 3,5 y 5  $\mu\text{m}$ ., en el cual se ubicaron los aislamientos: 2, 3, 17, 19,25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 36, 39, 43, 46, 47, 50, 51,56, 58 y 59.

Un segundo grupo, con ancho entre 5,1 y 6,5  $\mu\text{m}$ , en el cual se ubicaron los aislamientos 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 42, 44, 45, 48, 49, 52, 53, 54, 55 y 57 y un tercer grupo con los aislamientos de mayor ancho entre 6,6 y 8  $\mu\text{m}$ , con los aislamientos 5 y 21 (Figura 16).

**Figura 16. Ancho de conidias de *Colletotrichum* spp, *in vitro* a los diez (10) días después de incubación (ddi).**



**Fuente:** G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M. García D., 2016

El área de las conidias presentó diferencia altamente significativa, fluctuando entre 37 y 143  $\mu\text{m}$  (Tabla 12). Los aislamientos para facilidad de clasificación se agruparon en tres grupos.

El primer grupo, con un area entre 35 y 78  $\mu\text{m}$ ., en el cual se ubicaron los aislamientos: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 42, 43, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 56 y 59.

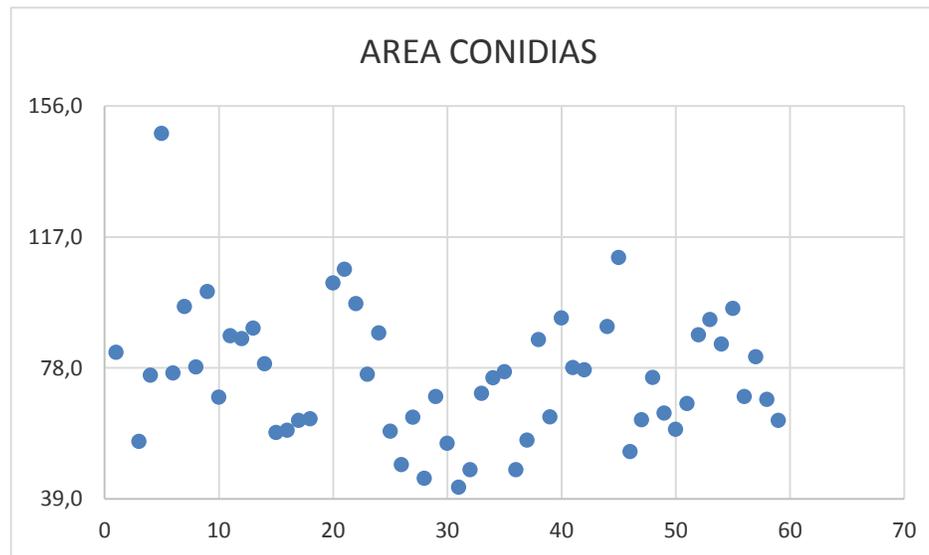
Un segundo grupo, con área entre 78.1 y 117  $\mu\text{m}$ , en el cual se ubicaron los aislamientos 1, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 20, 21, 22, 24, 29, 38, 40, 41, 44, 45, 52, 53, 54, 55, 57 y 58; y un tercer grupo con los aislamientos de mayor área, comprendidos entre 117,1 y 156  $\mu\text{m}$ , con el aislamiento 5 (Figura 17).

**Tabla 12. Tamaño en  $\mu\text{m}$  de conidias de *Colletotrichum* spp Area ( $\mu\text{m}^2$ )**

GRUPO	CEPAS	MIN	MAX	PROMEDIO
A	5	147,773	147,773	147,773
B	45, 21	107,403	110,913	109,158
B-C	21	107,403	107,403	107,403
C	21, 20	103,338	107,403	105,371
C-D	20	103,338	103,338	103,338
D	20, 9	100,711	103,338	102,025
D-E	9	100,711	100,711	100,711
E	9, 22, 7, 55	95,692	100,711	97,444
E-F	22, 7, 55	95,692	97,098	96,335
F	7, 55, 40, 53	92,410	95,692	94,870
F-G	55, 40, 54	92,410	95,692	93,659
G	7, 55, 40, 53, 44	90,272	96,275	93,505
G-H	55, 40, 53, 44	90,272	95,692	93,813
H	55, 40, 53, 44, 13	89,798	95,692	92,210
H-I	40, 53, 44, 13	89,798	92,877	91,339
I	40, 53, 44, 13, 24,52, 11,12, 38	86,472	92,877	89,149
I-J	44, 13, 24, 52, 11,12, 38	86,472	90,272	88,151
J	44, 13, 24, 52, 11,12, 38, 54	85,099	88,438	87,760
J-K	24, 52, 11,12, 38, 54	85,099	88,438	87,014
K	24, 52, 11,12, 38, 54, 1	82,612	88,438	86,385
K-L	12, 38, 54, 1	82,612	86,714	85,224
L	12, 38, 54, 1, 57	81,32	86,714	84,443
L-M	54, 1, 57	81,32	85,099	83,010
M	54, 1, 57, 14	79,198	85,099	82,057
M-N	1, 57, 14	79,198	82,612	81,043
N	1, 57, 14, 8, 41,42, 35,6	76,472	82,612	78,779
N-O	57, 14, 8, 41,42, 35,6	76,472	81,32	78,231
O	57, 14, 8, 41,42, 35,6, 23, 4, 48, 34	75,101	81,32	77,474
O-P	6, 23, 4, 48, 34	75,101	76,472	75,739

P	6, 23, 4, 48, 34, 33	70,456	76,472	74,858
P-Q	48, 34, 33	70,456	75,188	73,582
Q	48, 34, 33, 56, 29, 10	69,271	75,188	71,498
Q-R	33, 56, 29, 10	69,271	70,456	69,675
R	33, 56, 29, 10, 58, 51,49	64,581	70,456	68,458
R-S	56, 29, 10, 58, 51,49	64,581	69,49	68,125
S	56, 29, 10, 58, 51,49, 39, 27	63,303	69,49	66,930
S-T	58, 51,49, 39, 27	63,303	68,573	65,438
T	58, 51, 49, 39,27, 18, 47,59, 17	62,331	68,573	64,140
T-U	49, 39, 27, 18, 47,59, 17	62,331	64,581	63,048
U		58,768	64,581	61,972
U-V	18, 47,59, 17, 50, 16, 25, 15	58,768	62,565	60,890
V	18, 47,59, 17, 50, 16, 25, 15, 37	56,481	62,805	60,400
V-W	47,59, 17, 50, 16, 25, 15	56,481	62,565	60,100
W	47,59, 17, 50, 16, 25, 15, 37, 3	56,162	62,565	59,663
W-X	50, 16, 25, 15, 37, 3	56,162	59,735	58,283
X	50, 16, 25, 15, 37, 3, 30	55,522	59,735	57,888
X-Y	25, 15, 37, 3, 30	55,522	59,108	57,208
Y	25, 15, 37, 3, 30, 46	53,064	59,108	56,518
Y-Z	46	53,064	53,064	53,064
Z	46, 26,32, 36	47,713	49,216	49,429
Z-A	26, 32, 36	47,713	49,216	48,216
A	26, 32, 36, 28	45,110	49,216	47,440
A-B	32, 36, 28	45,110	47,721	46,848
B	32, 36, 28, 31	42,465	47,721	45,752
B-C	31	42,465	42,465	42,465
C	31, 43 19	36,792	42,465	38,858
C-D	43, 19	36,792	37,317	37,055
D	43, 19, 2	36,328	37,317	36,812

Fuente: G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M. García D., 2016

**Figura 17. Area de conidias  $\mu\text{m}$  *in vitro* a los diez (10) días después de incubación (ddi).**

Fuente: G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M. García D., 2016

### 3.2.4 Registros fotográficos

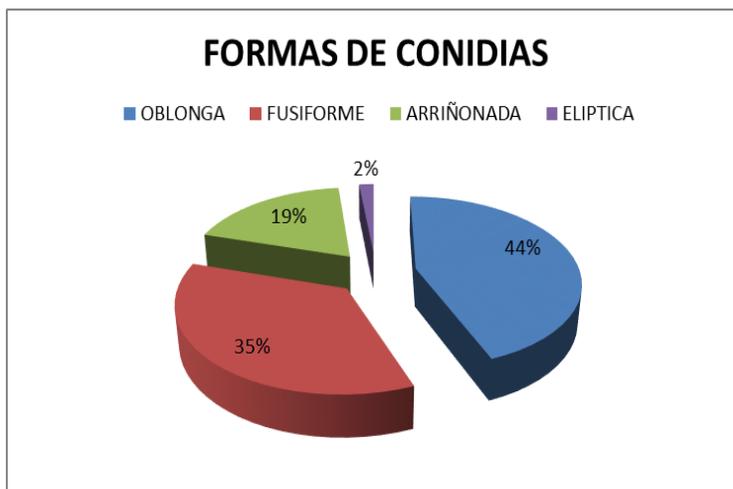
Para el registro fotográfico fué necesario el montaje de placas en portas y cubre objetos bien sellados. Se tomaron micrografías de los 59 aislamientos, para el posterior cálculo de las dimensiones de las conidias en el programa Image J.

### 3.2.5 Análisis de micrografías

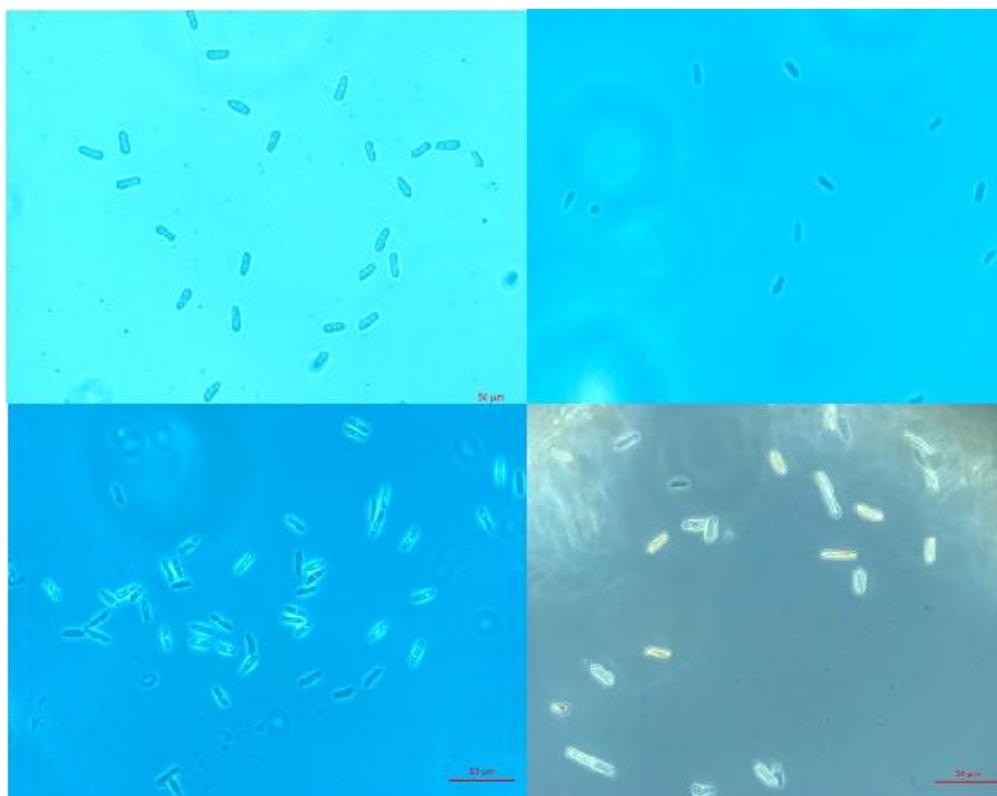
Para medir el tamaño de las conidias, se utilizaron las micrografías tomadas en el microscopio óptico de los 59 aislamientos, para la evaluación de 50 conidios y sus medidas en el programa Image J, obteniendo datos de largo, ancho y área.

### 3.2.6 Morfología de las conidias

La distribución de las formas de las conidias de *Colletotrichum* spp., se puede visualizar en la Figura 18. Las micrografías mostraron 4 formas diferentes de conidias, de acuerdo con (Afanador *et al.*, 2014) (Figura 19). En la figura 18, se representa la forma de las conidias de los 59 aislamientos, donde las oblongas obtuvieron el mayor porcentaje con un 44%, seguido de las fusiformes con un 35%, las arriñonadas con un 19% y las elípticas con tan solo un 2%.

**Figura 18. Distribución de formas de conidias de *Colletotrichum* spp.**

Fuente: G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P.; M, García D., 2016

**Figura 19: Morfología de conidias observada en los 59 aislamientos de *Colletotrichum* spp**

**A** conidias Oblongas observadas a 40x bajo contraste, **B** conidias Elípticas observadas a 20x en campo claro, **C** conidias Fusiformes observadas a 40x en contraste, **D** conidias Arriñonadas observadas a 40x bajo contraste.

Fuente: G. M. Cobo N.; D.F. Mosquera P., 2016

### 3.2.7 Tamaño de las conidias,

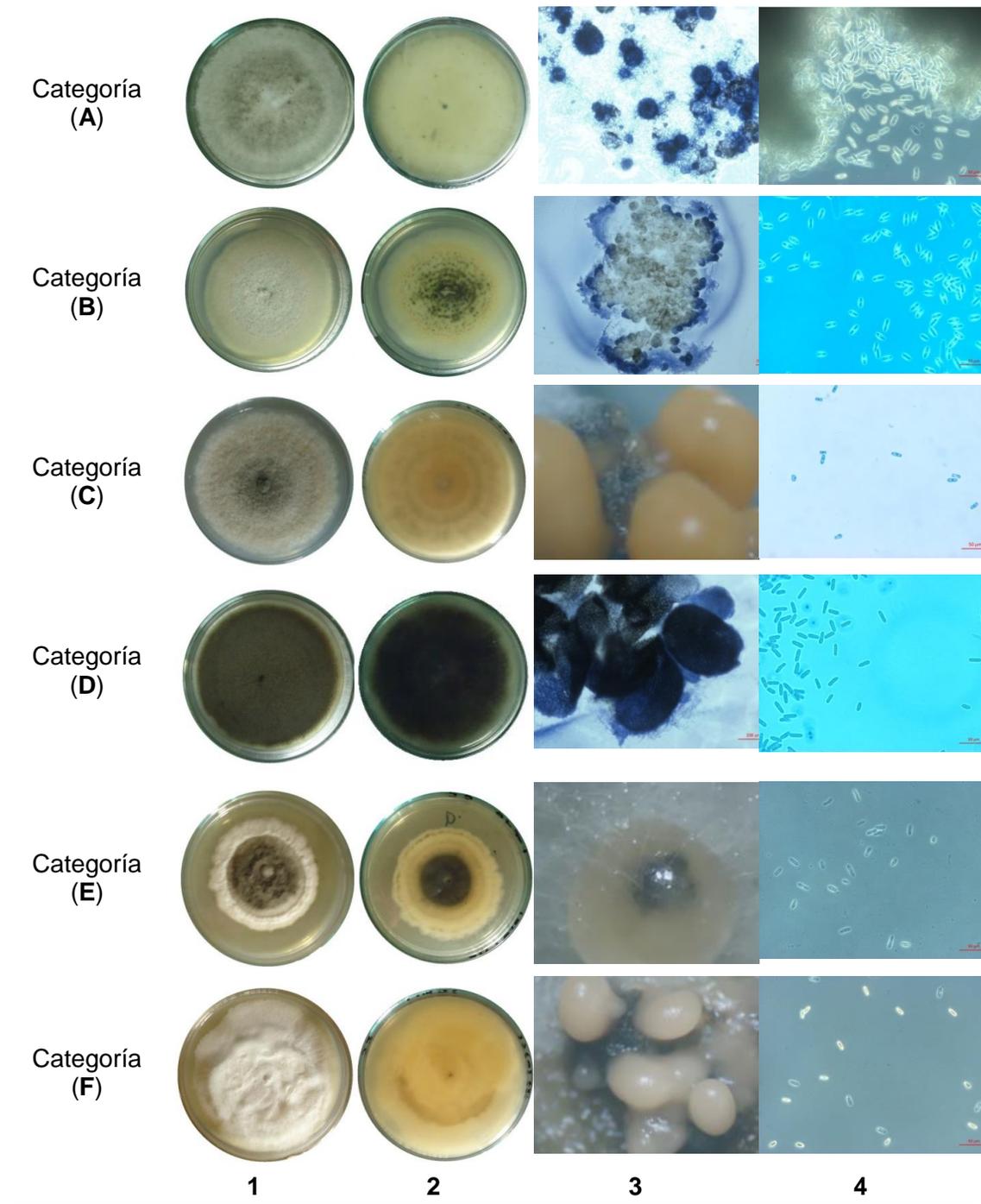
Los datos obtenidos en el programa Image J de área, largo y ancho de las conidias, para los 59 aislamientos fueron analizados en el programa SAS Deployment Wizard 9.4, para observar diferencias en el tamaño entre las mismas (Tabla 8).

En la Tabla 10, muestra la distribución de los aislamientos, con respecto al largo de las conidias, según el estadístico Duncan, el aislamiento 5 resultó tener el mayor tamaño con respecto a las demás y el aislamiento 2 presentó la menor longitud en sus conidias.

Así mismo, en la Tabla 11 se relaciona la distribución de tamaño de conidias, donde el aislamiento 5 presentó el mayor ancho y el 43 obtuvo el menor ancho de las conidias y la distribución de tamaño de las conidias con respecto al área ( $\mu\text{m}^2$ ), el aislamiento 5 obtuvo la mayor área y el aislamiento 2 representó la menor área en sus conidias con respecto a los demás aislamientos de *Colletotrichum* spp evaluados (Tabla 12).

En la figura 20 hace referencia a las características morfológicas de los aislamientos encontrados. En la tabla 13 se muestran las características generales de los diferentes aislamientos de *Colletotrichum* spp.

**Figura 20. Características morfológicas de aislamientos de *Colletotrichum* spp**



1. Anverso y 2. Reverso de aislamientos, diez días después de la siembra en medio PDA.,  
3. Acervulos y otras estructuras 4. Conidias (escala 50  $\mu$ m), (Prihastuti *et al.*, 2009).

**Fuente:** G. M. Cobo N.; D. F. Mosquera P., 2016.

Tabla 13. Características generales de los diferentes aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Aislamiento	Código	Tipo de Colonia R	Color anverso X	Color Reverso <sup>Y</sup>	Crecimiento radial (mm/día) <sup>Z</sup>	Conidia			
						Forma	Largo (µm)	Ancho (µm)	Área (µm <sup>2</sup> )
1	DQ2	A	738	807	4,2	Arriñonada	18	5	82
2	VEP3	A	904	908	4,2	Oblonga	10	4	36
3	SLM1	B	893	908	3,6	Oblonga	14	4	56
4	AC1-1	C	904	850	4,2	Arriñonada	17	5	75
5	AC3-2	A	904	737	4,2	Fusiforme	22	7	147
6	CSE2	B	893	814	4,2	Oblonga	16	5	76
7	CSH3	C	816	858	2,9	Oblonga	18	6	96
8	LUVJ3-2	C	868	693	3,6	Oblonga	16	5	78
9	CCh7	D	902	908	4,2	Arriñonada	20	6	100
10	LUVJB-1	B	794	814	3,9	Oblonga	15	5	69
11	REB2	C	902	798	3,7	Oblonga	17	6	87
12	VEP1	C	802	908	3,1	Oblonga	16	6	86
13	SECh1	C	781	908	3,6	Oblonga	17	6	89
14	ECA1	B	905	850	3,6	Arriñonada	16	5	79
15	CCh6	C	904	892	3,9	Oblonga	12	6	58
16	RB1	A	904	850	3,8	Oblonga	12	6	59
17	BP3	C	816	793	3,5	Fusiforme	16	4	62
18	YER1	B	816	806	4,2	Fusiforme	14	5	62
19	SMN1	B	800	764	3,9	Fusiforme	11	4	36
20	APE1	A	905	793	4,2	Arriñonada	21	5	103
21	RB4	B	903	857	4,1	Oblonga	18	7	107
22	ECA2-1	A	907	850	4,2	Arriñonada	21	5	97
23	AR1	A	907	857	4,3	Oblonga	16	5	76
24	ECA2	A	865	850	4,2	Arriñonada	19	5	88
25	TE1	E	903	901	3,8	Fusiforme	15	4	59

Aislamiento	Código	Tipo de Colonia R	Color anverso X	Color Reverso <sup>Y</sup>	Crecimiento radial (mm/día) <sup>Z</sup>	Conidia			
						Forma	Largo (µm)	Ancho (µm)	Área (µm <sup>2</sup> )
26	VT2-2	B	904	805	3,5	Fusiforme	13	4	49
27	P2	B	800	901	3,6	Arriñonada	17	4	63
28	VT2-1	B	907	843	3,3	Fusiforme	12	4	45
29	LUVJ3-1	B	843	901	2,9	Oblonga	14	6	69
30	TE2-1	B	905	857	2,9	Oblonga	13	4	55
31	VT5	B	900	855	2,8	Fusiforme	12	4	42
32	P2-1	B	878	908	3,5	Arriñonada	14	4	47
33	LUVJ3-3	A	865	764	4,1	Oblonga	15	5	70
34	RAr2	C	871	855	3,1	Fusiforme	17	5	75
35	VEP2	E	879	863	3,6	Oblonga	16	5	76
36	VT1-2	E	906	851	2,3	Oblonga	12	4	47
37	LUVJ4	B	865	908	3,8	Elíptica	13	5	56
38	Coll2B-3	A	816	695	3,5	Fusiforme	18	5	86
39	RAr1	C	903	869	4,1	Oblonga	15	5	63
40	BSM	C	903	844	3,9	Oblonga	15	7	92
41	TVL5	A	868	908	4,2	Fusiforme	17	5	78
42	AC3-4	F	903	908	4,1	Oblonga	16	5	77
43	YV6	B	909	908	3,6	Fusiforme	12	3	37
44	TE2-2	B	879	850	3,1	Oblonga	19	5	90
45	AC1-2	B	835	815	4	Arriñonada	20	6	110
46	VT1-1	E	906	899	2	Fusiforme	14	4	53
47	CChB	B	870	908	3,8	Fusiforme	15	4	62
48	P1C	B	816	820	3,8	Fusiforme	16	5	75
49	TVL4	D	903	908	3,8	Oblonga	15	5	64
50	CLI4	B	836	737	1,5	Fusiforme	15	4	59
51	AC1-3	E	901	868	2,7	Fusiforme	17	4	67
52	DQ2-1	C	901	901	3,9	Arriñonada	18	5	87

Aislamiento	Código	Tipo de Colonia	Color anverso X	Color Reverso <sup>Y</sup>	Crecimiento radial (mm/día) <sup>Z</sup>	Conidia			
						Forma	Largo (µm)	Ancho (µm)	Área (µm <sup>2</sup> )
53	AC3-1	E	868	901	3,1	Fusiforme	21	5	92
54	BP2	C	800	901	2,4	Fusiforme	17	5	85
55	AC4	C	868	850	3,9	Fusiforme	21	5	95
56	VT2-2	E	868	901	1,8	Fusiforme	17	4	69
57	DED-1	C	800	901	2,5	Fusiforme	17	5	81
58	LUVJ3-2	E	868	764	1,7	Oblonga	16	4	68
59	LUVJC	F	909	812	3,8	Oblonga	15	4	62

<sup>R</sup> **A.** Colonias con micelio esponjoso semi aéreo, gris claro y con abundante formación de peritecios; **B.** Colonias de color gris claro, micelio esponjoso rastrero; **C.** Colonias con anillos concéntricos color negro en el centro y a los lados gris-blanco, con abundantes acérvulos de color salmón; **D.** Colonias con micelio esponjoso, rastrero de color gris oscuro; **E.** Colonias con anillos color oscuro en el centro y claro a los lados, con micelio aéreo esponjoso de poco crecimiento; **F.** Colonias con micelio blanco aéreo de consistencia algodonosa. (Afanador *et al.*, 2014).

<sup>X</sup> <sup>Y</sup> para determinar el color de los aislamientos se utilizó la tabla de colores (The Online Auction Color Chart TM, 2004).

<sup>Z</sup> velocidad de crecimiento radial en (mm) / día de los 59 aislamientos de *Colletotrichum* spp, sembrados en PDA durante diez días.

**Fuente:** G. M. Cobo N.; D. F. Mosquera P., 2016.

## **3.3 Caracterización Molecular**

### **3.3.1 Extracción de ADN**

El proceso de extracción de ADN de los 59 aislamientos de *Colletotrichum* spp, se realizó siguiendo el protocolo del Kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit 50 (QIAGEN, 2013), el cual resultó muy práctico y con buenos resultados, permitiendo obtener las concentraciones de ADN entre 10 y 30 ng/μl, suficientes para la amplificación por PCR de los marcadores moleculares, La cuantificación del ADN se realizó por comparación con concentraciones conocidas del bacteriófago Lambda, evaluados a concentraciones de 100, 50 y 20 ng.

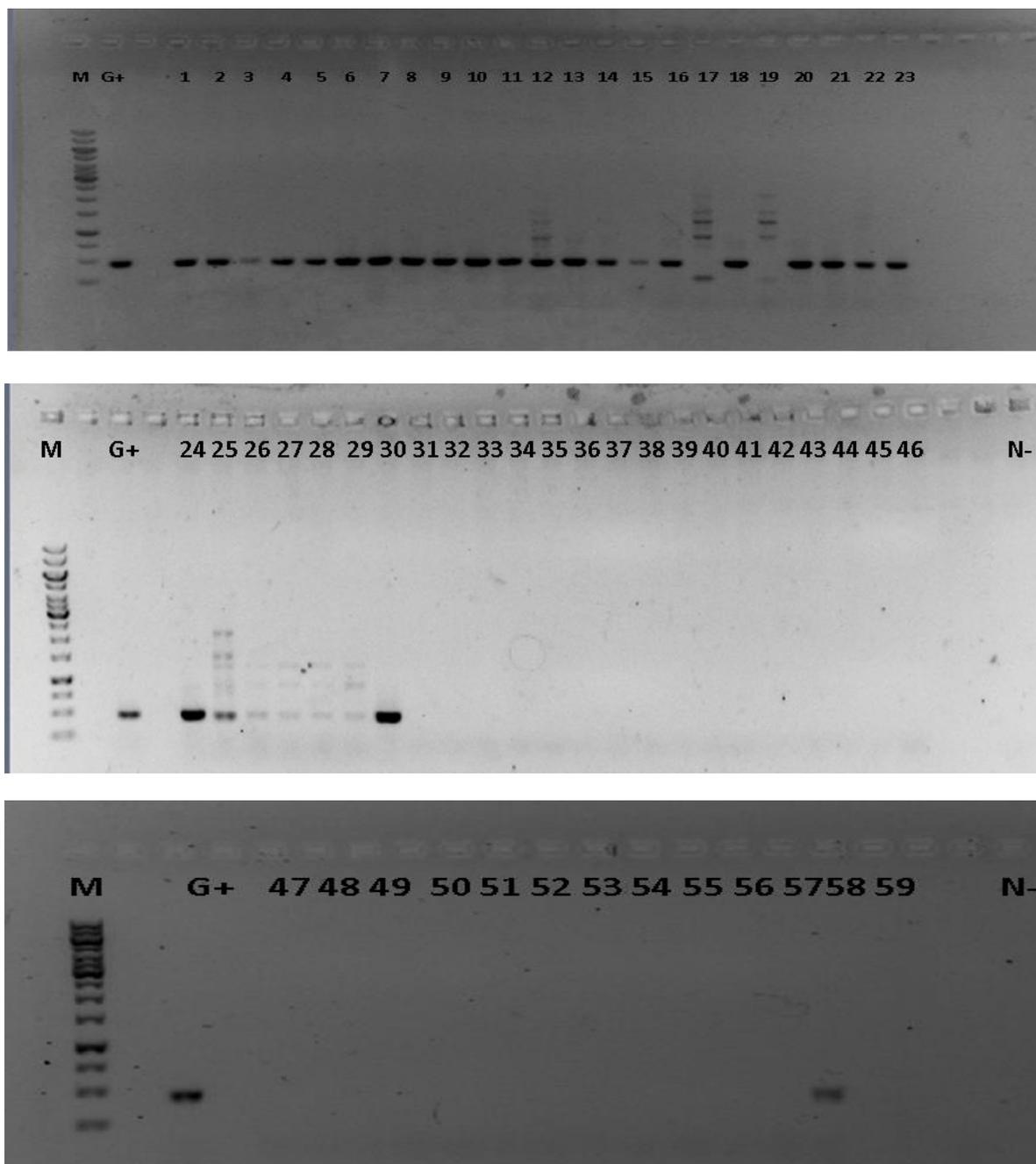
### **3.3.2 Proceso de Identificación de los complejos de *Colletotrichum* spp con primers específicos.**

El proceso de identificación molecular de especies de *Colletotrichum* spp se realizó empleando cebadores específicos, que permitieron la identificación de 37 de los 59 aislamientos obtenidos; los cuales confirman la presencia de al menos 3 diferentes especies de *Colletotrichum* spp como agentes causales de la antracnosis en aguacate var, Hass en el departamento del Valle del Cauca, (Tabla 14).

El uso del cebador universal ITS4 en combinación con el cebador específico CgInt para la especie *C. gloesporioides*, permitió la identificación de 25 individuos de la población; arrojando un amplificado de 450 pares de bases (pb), a una temperatura de alineamiento de 62,1°C (Figura 21), Con el primer CaInt2, específico para la especie *C. acutatum*, permitió la identificación de 12 individuos, produciendo un fragmento de 490 pb (Figura 22).

### 3.3.2.1 Amplificación de los aislamientos con los Primers CgInt / ITS4

Figura 21: Electroforesis de muestras positivas de *Colletotrichum* spp., producto de PCR para el Primer CgInt



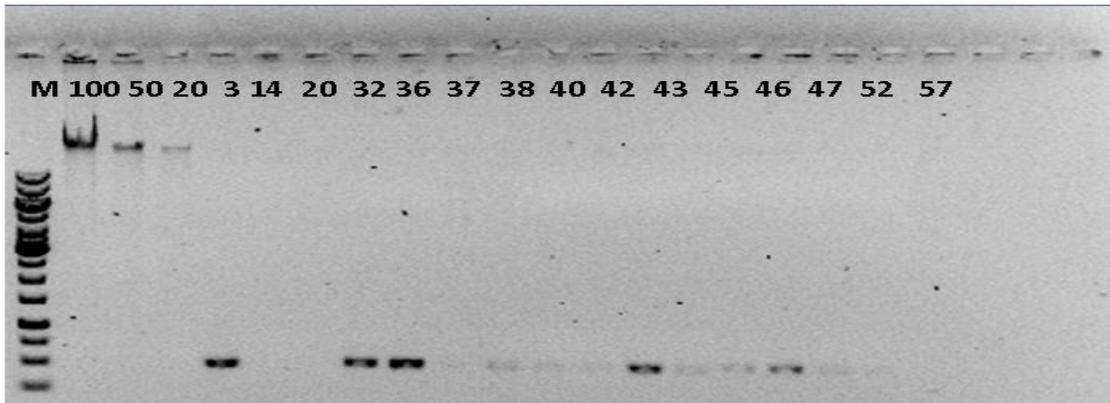
**A.** Electroforesis, muestras de 1-23. **B.** Electroforesis muestras 24 a 46. **C.** Electroforesis muestras de 47 a 59. M. Marcador molecular 1Kb. **G+** ADN de *Colletotrichum gloeosporioides* (Afanador K., L. et al, 2014). **N-** Agua MQ

A una temperatura de alineamiento de 62,1°C a 30". Geles de agarosa, que visualizan el amplificado de los aislamientos identificados como *C. gloesporioides*, con un fragmento de 450 pb.

El Primer CgInt, permitió identificar las muestras positivas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12,13, 14, 15, 16, 18, 20, 24, 30 y 58, y las muestras 17, 19 y 25 dieron inespecíficas para este primer.

#### ▪ 3.3.2.2 Amplificación de los aislamientos con los Primers Calnt2 / ITS4

**Figura 22. Amplificado de aislamientos identificados como *Colletotrichum acutatum***



**M** Marcador de peso molecular 1000 Kb. Concentraciones de  $\lambda$ 100,  $\lambda$ 50 y  $\lambda$ 20 ng

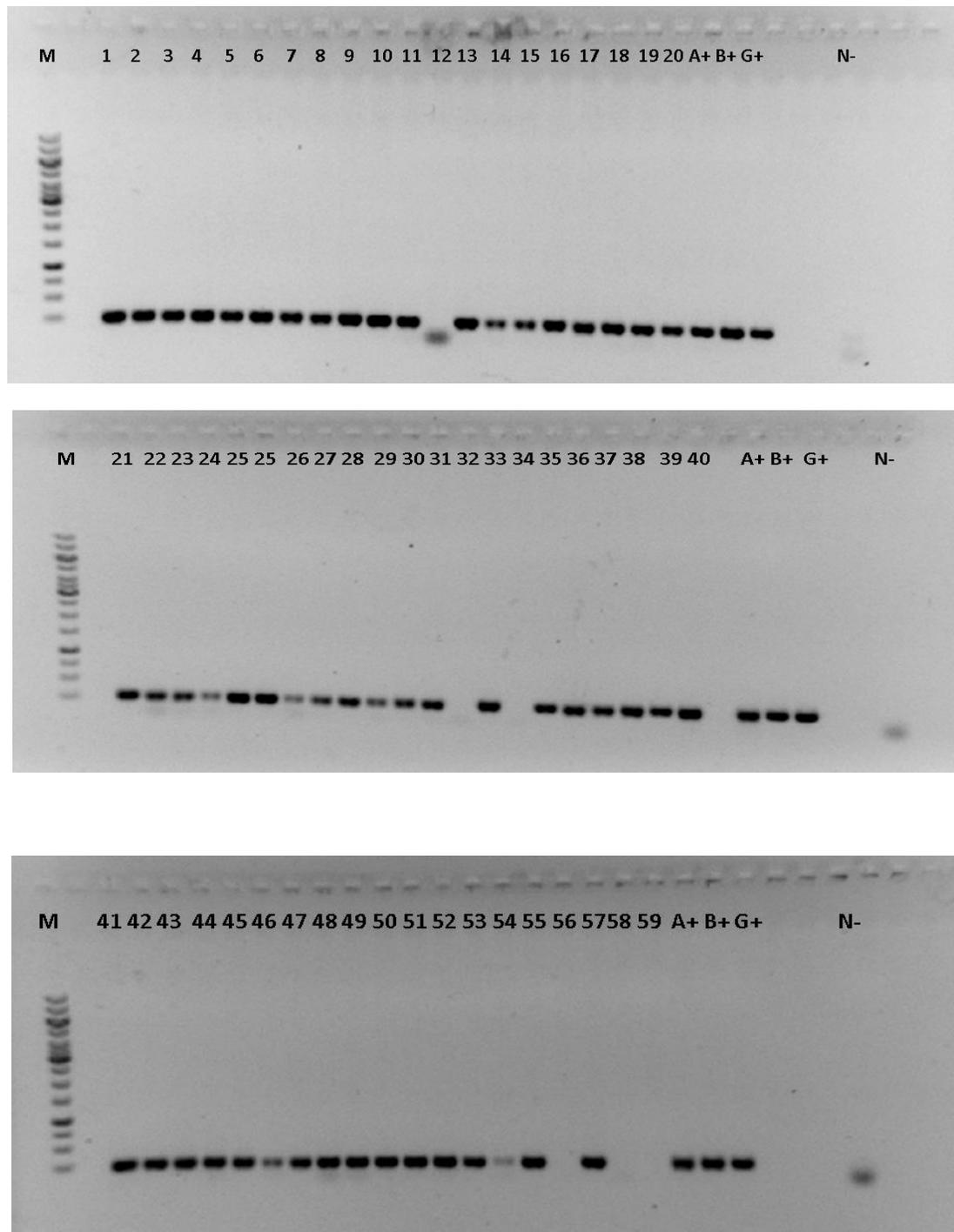
Electroforesis de muestras positivas de *Colletotrichum* spp, producto de PCR para el primer Calnt2 con una temperatura de alineamiento de 60,5°C a 30". Muestras positivas para este primer 3, 32, 36, 43 y 47. Amplificado de los aislamientos identificados como *Colletotrichum acutatum* con un fragmento de 490 pb., con grado de identificación de especies bajo.

### 3.3.3 Proceso de Identificación de los complejos de *Colletotrichum* spp con Primers complementarios

Debido a que los primers específicos, no fue posible identificar todos los aislamientos, se usaron primers complementarios para diferentes regiones; así: se usó **CHS** Chitin synthase con 50 aislamientos positivos, a una temperatura de alineamiento de 58°C por 30"; **ACT** Actin, con 30 aislamientos positivos, a una temperatura de alineamiento de 59°C por 30" ; **GAPDH** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, con 52 aislamientos positivos, a una temperatura de alineamiento de 59,6°C por 30" ; **CAL** Calmodulin, con 14 aislamientos positivos, a una temperatura de alineamiento de 54,1°C por 30" y **TUB2**  $\beta$ -Tubulin, con 25 aislamientos positivos, a una temperatura de alineamiento 55°C por 30"; esto con el fin de identificar y determinar razas y clados que demuestren la variabilidad del complejo *Colletotrichum* spp, asociado a la antracnosis en aguacate var Hass, para el Valle del Cauca. (Figura 23 a Figura 27).

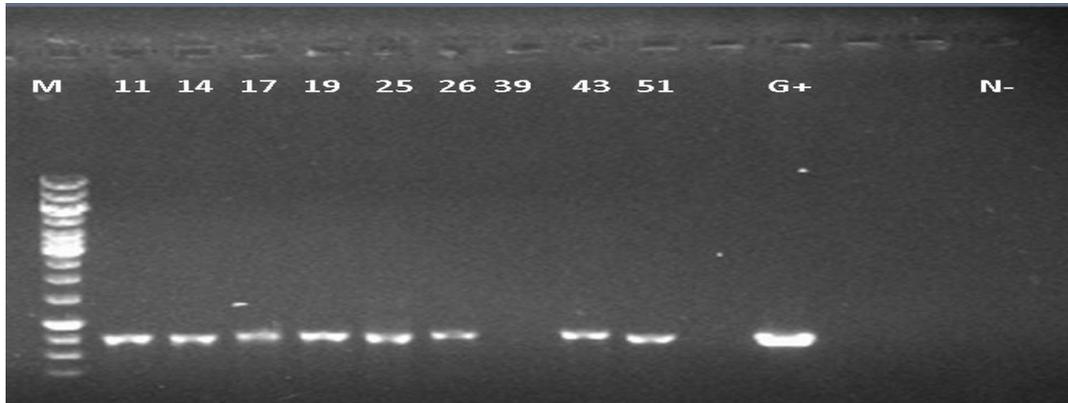
### 3.3.3.1 Amplificación de los aislamientos con el Primer GD

Figura 23: Electroforesis GD final muestras positivas a 59,6 °C a 30''



- 3.3.3.2 Amplificación de los aislamientos con el Primer CAL

Figura 24: Electroforesis CAL Final, 54,1 ° C 30".

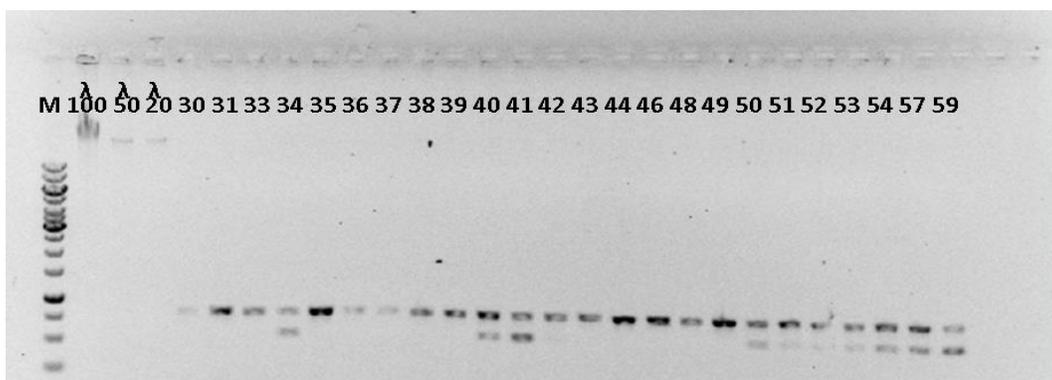


**M** Marcador de peso molecular 1000 Kb. **N-**. Muestra negativa **G+**. Control positivo para *C. gloeosporioides* (Afanador. L. et al., 2014).

Los aislamientos positivos para el Primer CAL fueron 11, 14, 17, 19, 25, 26, 43 y 51, Control positivo para *C. gloeosporioides*. Este Primer, no permite formar clados definidos.

- 3.3.3.3. Amplificación de los aislamientos con el Primer TUB

Figura 25: Electroforesis TUB final 55°C a 30"

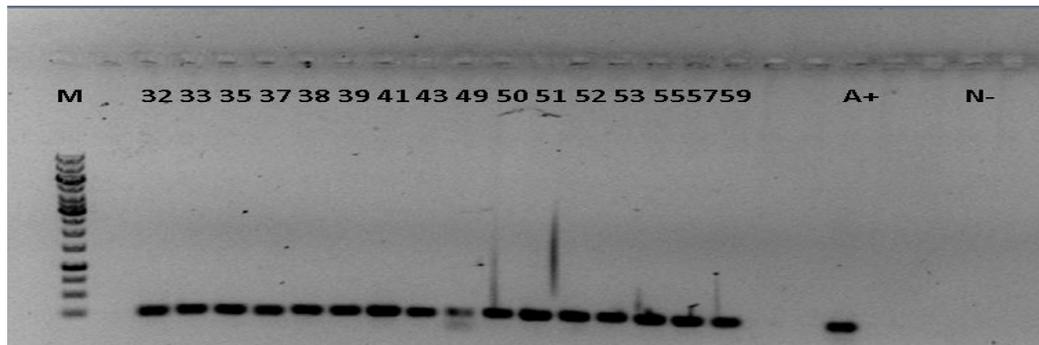


**M** Marcador de peso molecular 1000 Kb. Concentraciones de  $\lambda$ 100,  $\lambda$ 50 y  $\lambda$ 20 ng

Para el Primer TUB, los aislamientos que dieron positivos fueron 31, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 46, 48 y 49; los aislamientos inespecíficos fueron 34, 40, 41, 50, 51, 52, 53, 54, 57 y 59.

#### 3.3.3.4 Amplificación de los aislamientos con el Primer ACT

Figura 26. ACT Muestras positivas 59°C, 30”

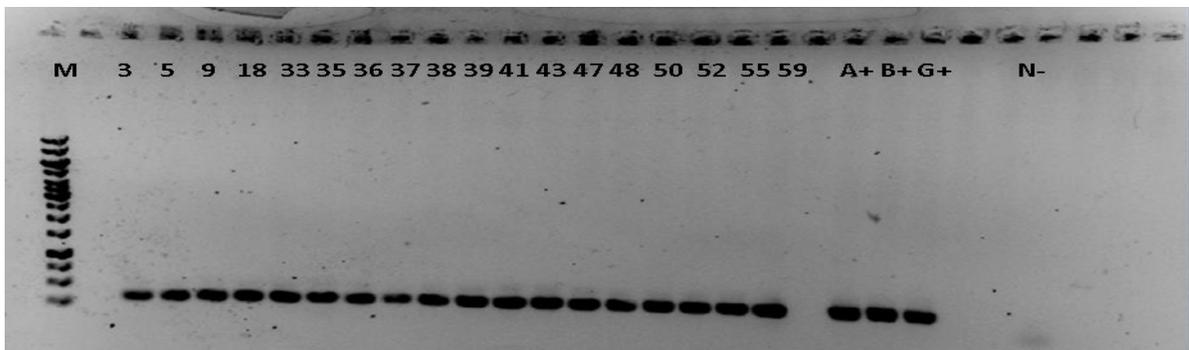


**M** Marcador de peso molecular 1000 Kb. **N-**. Muestra negativa **A+**. Control positivo para *C. acutatum*. (Afanador. L. et al., 2014).

Los aislamientos positivos para el primer ACT fueron 32, 33, 45, 37, 38, 39, 41, 43, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 57 y 59, cuyo control positivo fue *C. acutatum*.

#### 3.3.3.5. Amplificación de los aislamientos con el Primer CHS

Figura 27. CHS muestras positivas 58°C a 30”



**M** Marcador de peso molecular 1000 Kb. **N-**. Muestra negativa **A+**. Control positivo para *C. acutatum*. **B+**. *C. boninense* y **G+**. *C. gloeosporioides* (Afanador. L. et al., 2014).

Los aislamientos positivos para CHS fueron 3, 5, 9, 18, 33, 35,36, 37, 38, 39, 41,43, 47, 48, 50, 52, 55 y 59, positivo para los tres controles,

### **3.4 Caracterización molecular**

Los análisis de secuenciación permitieron establecer diferentes regiones del genoma, con el fin de establecer la identificación de las diferentes especies de *Colletotrichum* presentes y poder establecer la diversidad existente en cada municipio y entre municipios, donde actualmente se cultiva aguacate var, Hass (Tabla 14).

Tabla 14: Identificación Aislamientos Por Métodos Moleculares

Cebador	Identificación	Cantidad	Muestra	Localidad	Método
Calnt2	<i>Glomerella acutata</i>	6	37, 47, 43, 32, 46, 36	La Unión, Caicedonia, Yotoco, Palmira, Versalles (2)	PCR Muestra A+ (Afanador, 2014)
CgInt	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	10	7, 6, 18, 21, 30, 22, 24, 20, 4, 1	Caicedonia (2), Yotoco, Roldanillo, Toro, El Cairo (2), Argelia (2), El Dovio	PCR Muestra G+ (Afanador, 2014)
Calmodulin (CAL)	<i>Colletotrichum</i> spp	5	17, 21, 19, 43, 11	Bolívar, Roldanillo, Sevilla, Yotoco, Restrepo	NCBI
	<i>Colletotrichum kahawae</i> subesp. Ciggaro	1	14	El Cairo	NCBI
Chitin syntetase 1 (CHS)	<i>Colletotrichum siamense</i>	7	59, 36, 52, 55, 5, 18, 33	La Unión, Versalles, El Dovio, Argelia (2), Yotoco, La Unión	NCBI
	<i>Colletotrichum</i> spp	9	48, 50, 38, 39, 36, 37, 43, 47, 3	Palmira, Caicedonia, Sevilla (2), Roldanillo, Versalles, La Unión, Yotoco, Caicedonia	
	<i>Colletotrichum fruticola</i>	1	9	Caicedonia	
Glyceraldehyde- 3-fosphate dehydrogenase (GAPDH) (GD)	<i>Colletotrichum</i> spp	9	52, 55, 1, 10, 50, 51, 36, 37, 43	Dovio (2), Argelia (2), La Unión (2), Caicedonia, Versalles, Yotoco	NCBI
	<i>Colletotrichum tropicale</i>	3	39, 38, 33	Roldanillo, Sevilla y La Unión	
	<i>Colletotrichum fruticola</i>	1	6	Caicedonia	
Actina (ACT)	<i>Colletotrichum</i> spp	11	55, 53, 52, 50, 51, 33, 39, 38, 32, 42, 37	Argelia (3), ElDovio, Caicedonia, La Unión (2), Roldanillo, Sevilla, Palmira, Yotoco	NCBI
	<i>Colletotrichum</i> spp	2	35, 59	Versalles, La Unión	
	<i>Colletotrichum fruticola</i>	2	41, 49	Toro (2)	
$\beta$ -tubulin 2 (TUB)	<i>Colletotrichum</i> spp	2	52, 50	ElDovio, Caicedonia	NCBI

A continuación se presenta la lista de los aislamientos que no pudieron ser identificados con los cebadores evaluados y que se secuenciaron, donde no se llegó a determinar la especie a la cual

se agrupaba y otras que no se identificaron por ninguna metodología y quedan pendientes de secuenciación:

Identificación	Cantidad	Aislamiento	Localidad
<i>Colletotrichum</i> spp	8	3, 10, 11, 17, 19, 48, 50, 51, 53	Sevilla (2), La Unión, Restrepo, Bolívar, Palmira, Caicedonia, Argelia (2).
No Identificadas	22	2, 8, 12, 13, 15, 16, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 34, 40, 42, 44, 45, 54, 56, 57, 58	Versalles (6), La Unión (3), Argelia (3), Bolívar (2), Sevilla, Caicedonia, Toro (2), Palmira, Dovio, Roldanillo (2).

### 3.4.1 Análisis de máxima parsimonia para la región GD

La historia evolutiva fue inferida usando el método de máxima parsimonia, y a partir de ese análisis se generaron los seis árboles más parsimoniosos, donde el índice de consistencia de datos fué de 0.85 y el índice de retención de 0.98, donde el índice compuesto fue de 0.87, el cual fue para todos los sitios parsimoniosamente informativos, El porcentaje de replicaciones para cada árbol se realizó con un bootstrap de 2000 repeticiones o permutaciones.

Para este análisis se incluyeron 74 secuencias y se consideró que las posiciones 1, 2 y 3 no eran codificantes, Al final se obtuvieron un total de 200 posiciones para cada una de las secuencias, donde no se incluyen los gaps. El análisis evolutivo se realizó en el Programa Mega 7. Figura28.

El grado de discriminación que presenta la región GD no es suficiente para formar clados definidos entre las especies de *Colletotrichum*, Para algunos aislamientos, como **GD\_2** y **GD\_55**, presentan una agrupación intermedia entre *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. siamense*; por lo tanto, los aislamientos son denominados *Colletotrichum* spp, Este mismo escenario se observa para otros aislamientos analizados en el presente estudio, como para el caso de **GD\_1**, **GD\_10**, **GD\_51**, **GD\_36** y **GD\_37**.

---

Considerando que el nivel de similitud obtenido en el Blast fue de 100% para cada una de las accesiones que fueron empleadas para el análisis, se puede identificar que la región GD 18S del genoma presenta variación considerable, pero al mismo tiempo el grado de discriminación entre especies es bajo. Estas especies de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. tropicale*, como se observa en el árbol de Máxima parsimonia, están estrechamente relacionadas. Con esto se puede identificar que hay un grado de diversidad importante entre las especies de *Colletotrichum* spp. El grupo externo a considerar fue *Phytophthora palmivora*. (Figura 28).

**Figura 28.: Arbol filogenetico para la región GD**

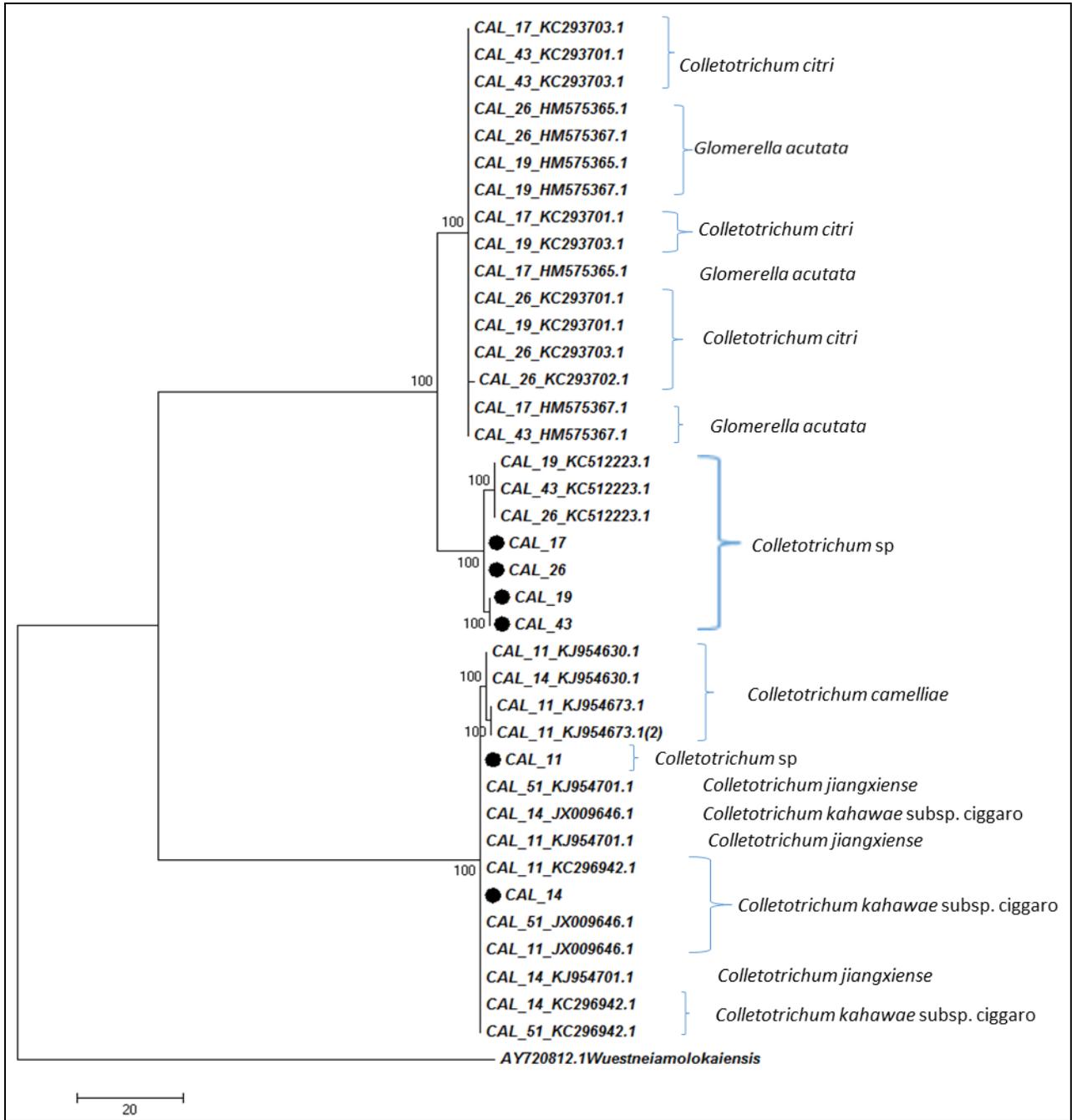
### 3.4.2 Análisis de máxima parsimonia para la región CAL

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima parsimonia, A partir de ese análisis se generaron los 10 árboles más parsimoniosos, donde el índice de consistencia de datos fué de 0,93 y el índice de retención de 0,99, donde el índice compuesto fue de 0,95, el cual fue para todos los sitios parsimoniosamente informativos, El porcentaje de replicaciones para cada árbol se realizó con un bootstrap de 2000 repeticiones o permutaciones. Para este análisis se incluyeron 39 secuencias y se consideró que las posiciones 1, 2 y 3 no eran codificantes, Al final se obtuvieron un total de 200 posiciones para cada una de las secuencias, donde no se incluyen los gaps. El análisis evolutivo se realizó en Mega 6. Figura 29.

Región del genoma altamente variable, donde no se observa una buena discriminación de especies. El grado de discriminación que presenta la región CAL no es suficiente para formar clados *definidos* con todos los aislamientos de evaluados entre las especies de *Colletotrichum*. Para los aislamientos **CAL\_17**, **CAL\_26**, **CAL\_19** y **CAL43** presentaron una agrupación intermedia entre *Glomerella acutata* y *Colletotrichum camelliae*, por lo que se determinaron como *Colletotrichum* sp., correspondiente a los municipios de Bolívar, Versailles, Sevilla y Yotoco respectivamente.

Este mismo comportamiento se visualiza con el aislamiento **CAL\_11** que se encuentra entre las especies *Colletotrichum camelliae* y *C. jiangxiense*, sin determinar una especie en particular, por lo cual se considera como *Colletotrichum* sp., del municipio de Restrepo. Se puede visualizar que para los aislamientos evaluados con esta región el grado de discriminación no permitió la identificación de la mayoría de los aislamientos. En el aislamiento 14, dentro del árbol filogenético se identifica como perteneciente a la especie *Colletotrichum kahawe subsp*, Ciggaro, del municipio del Cairo. Considerando que el nivel de similaridad obtenido en el Blast fue del 100% para cada una de las accesiones que fueron empleadas para el análisis de máxima parsimonia. El grupo externo a comparar fue *Wuestneia molokalensis*. (Figura 29).

Figura 29: Arbol filogenético para la región CAL



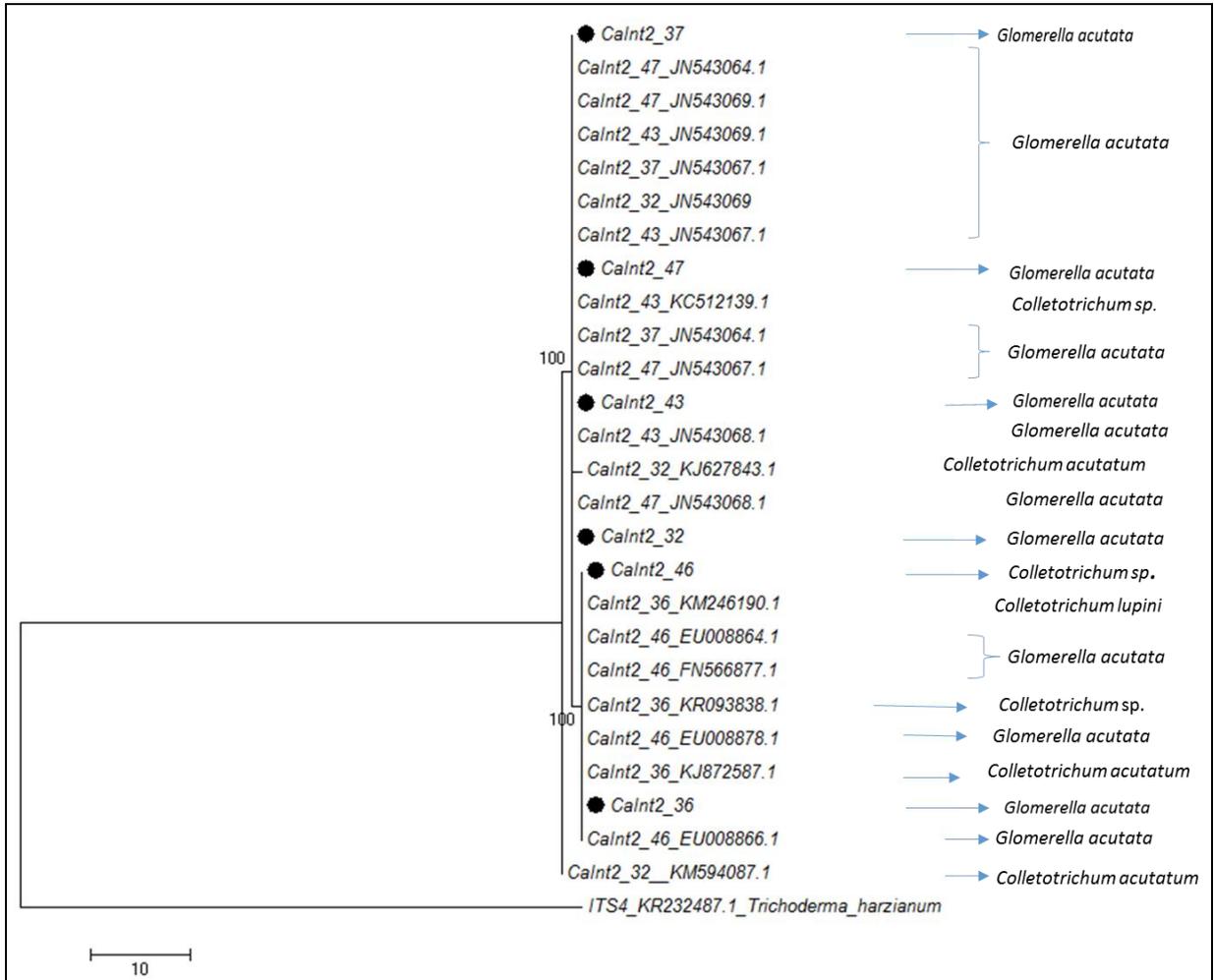
### 3.4.3 Análisis de máxima parsimonia para la región Calnt2

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima parsimonia, A partir de ese análisis se generaron los 10 árboles más parsimoniosos, donde el índice de consistencia de datos fué de 0,90 y el índice de retención de 0,92, donde el índice compuesto fue de 0,92, el cual fue para todos los sitios parsimoniosamente informativos, El porcentaje de replicaciones para cada árbol se realizó con un bootstrap de 2000 repeticiones o permutaciones. Para este análisis se incluyeron 27 secuencias y se consideró que las posiciones 1, 2 y 3 no eran codificantes, El análisis evolutivo se realizó en Mega 7.

Los criterios que se utilizaron para seleccionar los aislamientos seleccionados en el NCBI fueron a partir del Blast con un grado de similaridad del 100% y un value menor o igual a 0,00, De acuerdo con el árbol de Máxima Parsimonia, el grado de discriminación de la región Calnt2 permitió la identificación de algunos aislamientos como **Calnt2\_37**, **Calnt2\_47**, **Calnt2\_43**, **Calnt2\_32** y **Calnt2\_36**, los cuales presentan gran similaridad con las secuencias de *Glomerella acutata*, reportadas previamente, Por lo tanto, hay una probabilidad de que los aislamientos obtenidos en este estudio pertenezcan a *G. acutata*, ya que el valor bootstrap que soporta este cluster es del 100%, Para el aislamiento Calnt2\_46 se pudo identificar que presenta una agrupación intermedia entre *Colletotrichum acutata* y *C. lupini*, lo que se determinó como *Colletotrichum* sp., ya que no está muy definida la especie reportada.

El nivel de similaridad obtenido en el Blast fue del 100% para cada una de las accesiones que fueron empleadas para el análisis de Máxima Parsimonia, la región Calnt2 18S del genoma se presentó variaciones, pero al mismo tiempo el grado de identificación entre especies fué bajo, Todos estos aislamientos, producto de PCR con la región Calnt2 específico para *Colletotrichum acutatum* habían sido confirmados, mediante electroforesis (Figura 30).

Figura 30.: Arbol filogenético para la región Calnt2



### 3.4.4 Análisis de máxima parsimonia para la región CgInt

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima parsimonia, A partir de ese análisis se generaron los 10 árboles más parsimoniosos, donde el índice de consistencia de datos fué de 0,90 y el índice de retención de 0,95, donde el índice compuesto fue de 0,90, el cual fue para todos los sitios parsimoniosamente informativos, El porcentaje de replicaciones para cada árbol se realizó con un bootstrap de 1000 repeticiones o permutaciones. Para este análisis se incluyeron 27 secuencias de nucleótidos y se consideró que las posiciones 1, 2 y 3 no eran codificantes, Al final se obtuvieron un total de 419 posiciones para cada una de las secuencias, donde no se incluyen los gaps, El análisis evolutivo se realizó en el Programa MEGA 7.

El nivel de similaridad obtenido en el blast fue del 100%, para cada una de las accesiones que fueron empleadas para los análisis de máxima parsimonia, pudiéndose identificar que la región CgInt 18S del genoma presenta una variación considerable entre las especies de *Colletotrichum*, lo que confiere que los aislamientos evaluados podría haber un grado de variación importante entre las especies de *C. gloeosporioides*.

El grado de discriminación que presentó la región CgInt no fue suficiente para formar clados definidos entre las especies de *Colletotrichum*, ya que esta región es específica para *Colletotrichum gloeosporioides* y todos los aislamientos evaluados con esta región presentaron una agrupación intermedia, Así, el aislamiento **CgInt\_7** presenta una agrupación intermedia entre *Colletotrichum theobromicola* y *C. gloeosporioides*, el aislamiento **CgInt\_6** está entre *C. theobromicola* y *C. frutícola*, aislamientos **CgInt\_18** y **CgInt\_21** entre *Colletotrichum frutícola* y *C. gloeosporioides*, el aislamiento **CgInt\_30** está entre *Colletotrichum frutícola* y *C. ignotum*, y los aislamientos **CgInt\_22**, **CgInt\_24**, **CgInt\_20**, **CgInt\_4** y **CgInt\_1**, se encuentran entre *C. theobromicola* y *C. frutícola*, por lo tanto se consideran en este estudio como una especie diferente, y por lo que se cataloga como *Colletotrichum* spp, El grupo externo a comparar fue *Trichoderma harzianum*, el cual demostró un grupo muy aparte de los aislados de *Colletotrichum*. (Figura 31).

**Figura 31. Màxima Parsimonia para la región CgInt**

### 3.4.5 Análisis de máxima parsimonia para la región CHS

El grado de discriminación que presentó la región CHS puede formar algunos clados definidos entre las especies de *Colletotrichum*, Para los aislamientos pasados **CHS\_ 59** y **CHS\_36** corresponden a *Colletotrichum siamense*, de los municipios de La Unión y Versalles; los aislamientos **CHS\_48** Y **CHS\_50**, corresponden a *Colletotrichum* sp., de los municipios de Palmira y Caicedonia, porque estos aislamientos presentan una agrupación intermedia entre los aislamientos obtenidos del Blast con *Colletotrichum* sp.

Los aislados **CHS\_52**, **CHS\_55**, **CHS\_5**, **CHS\_18**, identificado como la especie *C. siamense*, de los municipios de El Dovio, Argelia (2) y Yotoco, respectivamente; el aislado **CHS\_33**, corresponde a la especie *C. tropicale*, del municipio de La Unión; **CHS\_38** y **CHS\_39**, municipios de Sevilla y Roldanillo; **CHS\_9**, identificado como *Colletotrichum frutícola*, del municipio de Caicedonia; los aislamientos **CHS\_36**, **CHS\_37**, **CHS\_43**, **CHS\_47** y **CHS\_3**, identificados como *Colletotrichum* sp., de los municipios Versalles, La Unión, Yotoco, Caicedonia y Sevilla, respectivamente, no se identificó ninguna especie en particular.

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima parsimonia, A partir de ese análisis se generaron los 5 árboles más parsimoniosos, donde el índice de consistencia de datos fué de 0,92 y el índice de retención de 0,98, donde el índice compuesto fue de 0,90, el cual fue para todos los sitios parsimoniosamente informativos, El porcentaje de replicaciones para cada árbol se realizó con un bootstrap de 2000 repeticiones o permutaciones. Para este análisis se incluyeron 81 secuencias de nucleótidos y se consideró que las posiciones 1, 2 y 3 no eran codificantes, Al final se obtuvieron un total de 246 posiciones para cada una de las secuencias, donde no se incluyen los gaps. El análisis evolutivo se realizó en el Programa MEGA 7. (Figura 32).

**Figura 32.: Arbol filogenético para la región CHS**

### 3.4.5. Análisis de máxima parsimonia para la región ACT

El grado de discriminación que presentó la región **ACT** puede formar algunos clados definidos entre las especies de *Colletotrichum*, en comparación con aislados obtenidos del Blast. Para los aislamientos **ACT\_55**, **ACT\_53** y **ACT\_52** identificados como *Colletotrichum* sp, de los municipios de La Argelia y El Dovio respectivamente; los aislamientos **ACT\_35** y **CHS\_59**, identificados como *Colletotrichum seamense*, de los municipios de Versalles y La Unión.

Los aislados **ACT\_41** y **ACT\_49** identificados como *C. frutícola*, del municipio de Toro. El aislado **ACT\_50**, identificado como la especie *Colletotrichum* sp del municipio de Caicedonia; el aislado **CHS\_51**, identificado como *C. kahawae* subsp ciggaro, del municipio de La Argelia; **ACT\_33**, identificado como *Colletotrichum* sp del municipio de La Unión; los aislados **ACT\_39** y **ACT\_38** identificado como *Colletotrichum* sp, de los municipios de Roldanillo y Sevilla; los aislamientos **ACT\_32**, **ACT\_43** y **ACT\_37**, identificados como *Colletotrichum* sp., de los municipios Palmira, Yotoco y La Unión, respectivamente.

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima parsimonia. A partir de ese análisis se generó el árbol más parsimonioso, donde el índice de consistencia de datos fue de 0,91 y el índice de retención de 0.98, donde el índice compuesto fue de 0,90, el cual fue para todos los sitios parsimoniosamente informativos. El porcentaje de repeticiones para cada árbol se realizó con un bootstrap de 2000 repeticiones o permutaciones. Para este análisis se incluyeron 70 secuencias de nucleótidos y se consideró que las posiciones 1, 2 y 3 no eran codificantes. El grupo externo a comparar fue **ACT\_KP9423721\_ Fusarium fujicoroi**. El análisis evolutivo se realizó en el Programa MEGA 7. Figura 33.

**Figura 33. Árbol filogenético para la región ACT**

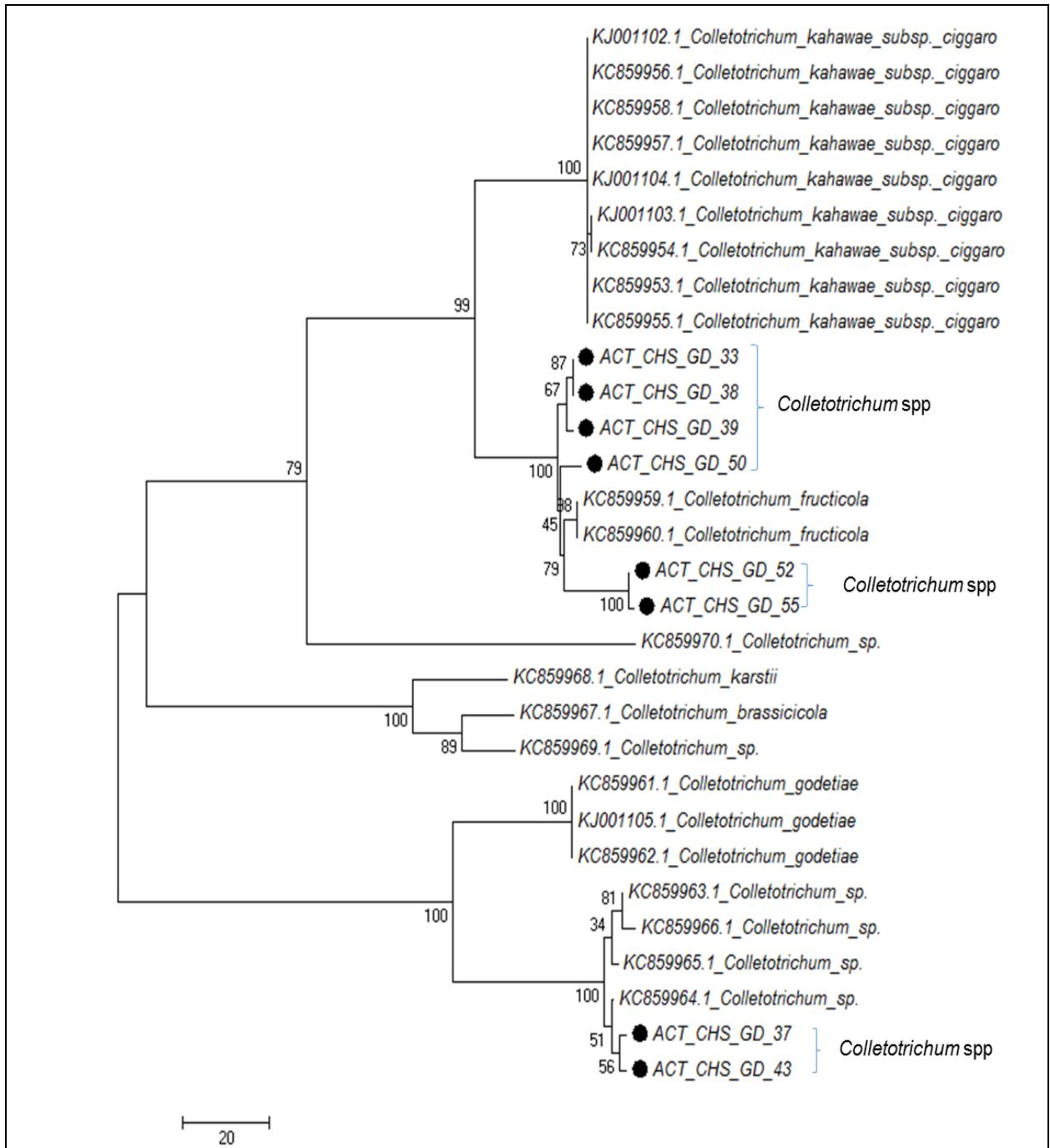
### 3.4.6 Análisis de máxima parsimonia para las regiones consenso ACT-CHS-GD

El consenso de las regiones ACT\_CHS\_GD, no presentaron clados definidos entre las especies de *Colletotrichum*, Teniendo en cuenta que el nivel de similaridad obtenido en el Blast, fue del 100% para cada una de las accesiones, que se emplearon para el análisis de máxima parsimonia, se puede establecer que existe variación entre las regiones, lo que no permite identificar especies en particular cuando se analizan en conjunto, ya que no hace discriminación de ninguna especie en estudio, pero se puede evidenciar que existe un grado importante de diversidad entre especies de *Colletotrichum*. Sin embargo, para los aislamientos **ACT\_CHS\_GD\_33**, **ACT\_CHS\_GD\_38**, **ACT\_CHS\_GD\_39** y **ACT\_CHS\_GD\_50**, que corresponde a los municipios de La Unión, Sevilla, Roldanillo y Caicedonia respectivamente, donde la distancia genética es pequeña con el cluster de *Colletotrichum frutícola*, lo que pudiere inferirse de que se trata de la misma especie.

Los aislamientos **ACT\_CHS\_GD\_37** y **ACT\_CHS\_GD\_43**, de los municipios de La Unión y Yotoco, forman un cluster aparte dentro del árbol, lo que le confiere que puede tratarse de una especie diferente de *Colletotrichum* spp, No se encontró grupo externo que fuera similar para las tres regiones.

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima parsimonia, A partir de ese análisis se generaron los 10 árboles más parsimoniosos, donde el índice de consistencia de datos fué de 0,82 y el índice de retención de 0,95, donde el índice compuesto fue de 0,80, el cual fue para todos los sitios parsimoniosamente informativos, El porcentaje de replicaciones para cada árbol se realizó con un bootstrap de 2000 repeticiones o permutaciones. Para este análisis se incluyeron 30 secuencias de nucleótidos y se consideró que las posiciones 1, 2 y 3 no eran codificantes, Al final se obtuvieron un total de 666 posiciones para cada una de las secuencias, donde no se incluyen los gaps, El análisis evolutivo se realizó en MEGA 7.(Figura 34).

Figura 34: Arbol filogenético de Consenso de las regiones ACT\_CHS\_GD



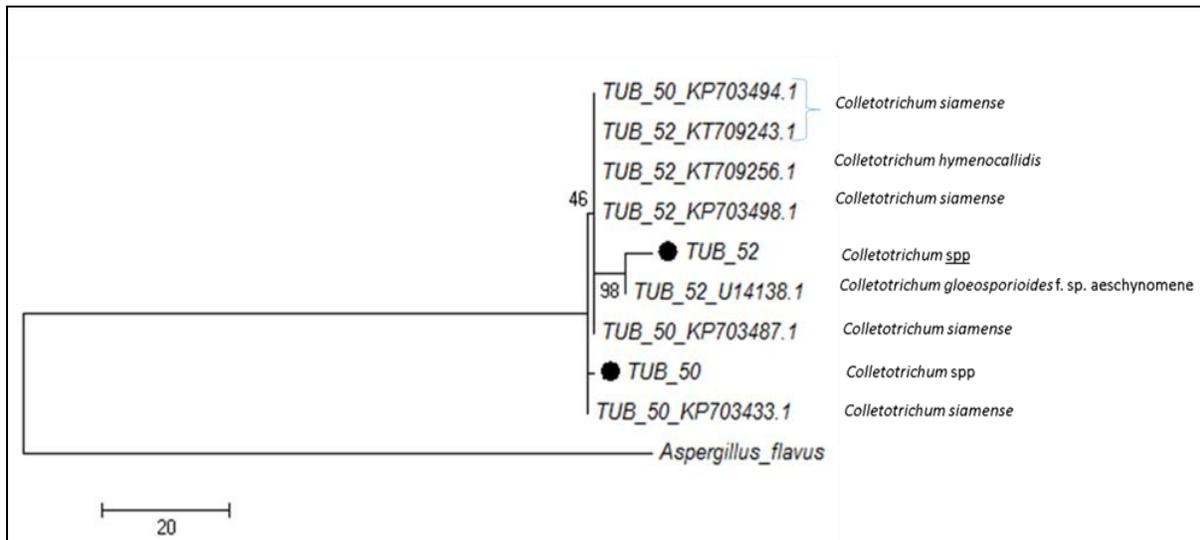
### 3.4.7 Análisis de máxima parsimonia para las regiones consenso TUB

El grado de discriminación que presenta la región TUB, no es suficiente para formar los clados definidos entre las diferentes especies de *Colletotrichum* spp, E aislamiento **TUB\_52** presenta una agrupación intermedia entre *Colletotrichum siamense* y *C. gloeosporioides* f.sp, *aeschynomene*, del municipio El Dovio; y el aislamiento **TUB\_50**, del municipio Caicedonia, presenta una agrupación intermedia entre dos *Colletotrichum siamense*, lo cual no determina una especie en particular, ya que la especie *C. siamense* está distribuida en diferentes partes del árbol.

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima parsimonia, A partir de ese análisis se generaron los 10 árboles más parsimoniosos, donde el índice de consistencia de datos fué de 0,99 y el índice de retención de 0,87, donde el índice compuesto fue de 0,76, el cual fue para todos los sitios parsimoniosamente informativos, El porcentaje de replicaciones para cada árbol se realizó con un bootstrap de 3000 repeticiones o permutaciones.

Para este análisis se incluyeron 9 secuencias de nucleótidos y se consideró que las posiciones 1, 2 y 3 no eran codificantes, Al final se obtuvieron un total de 680 posiciones para cada una de las secuencias, donde no se incluyen los gaps. El análisis evolutivo se realizó en el Programa MEGA 7. (Figura 35).

Figura 35: Arbol filogenético de la región TUB



### 3.5 Patogenicidad de *Colletotrichum* spp

Los primeros síntomas de la infección aparecieron generalmente a partir de los 3 - 4 ddi para frutos categorizados con grados de madurez 1 y 2, Para frutos inoculados con grado de maduración 0 no se observaron síntomas externos ni signos, solo lesiones internas menores a 3 mm de diámetro a los 7 ddi acompañados de la formación de capas suberizadas o corchosas alrededor de las lesiones generadas en el punto de inoculación (Figura 36), Sin importar el tamaño de los frutos, estos son susceptibles al desarrollo del hongo solo cuando se alcanza la etapa fenológica de madurez fisiológica y en adelante (Morales *et al*, 2009)

**Figura 36. Frutos con infecciones efectivas y síntomas de infecciones no efectivas**



**A.** Síntomas externos infección efectiva: depresión semicircular de tejido externo y cambio de coloración alrededor del punto de inoculación. **B.** Infección no efectiva: corte longitudinal del fruto sobre el punto de inoculación. Capa suberizada color marrón entre epicarpio y mesocarpio rodeando la herida de inoculación,

Esto se atribuye a la presencia de altas concentraciones de varios compuestos antifúngicos, siendo los más activos: el 1- acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12,15-dieno y el 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trieno. Por su parte, desde el momento de cosecha, la expresión de infecciones que eran quiescentes se debe a la degradación o catabolismo de los compuestos de dieno/trieno; esto se atribuye a la oxidación de dichos compuestos antifúngicos por parte de la lipoxigenasa, cuya actividad se regula, a

su vez, por un flavonoide, epicatequin, Un inhibidor inespecífico presente en el pericarpio de frutos inmaduros y ausente en frutos maduros (Prusky 2003). Por lo anterior, se propuso para evaluación de pruebas de patogenicidad frutos en grado de madurez fisiológica, por categorías, expresadas en la figura 37.

**Figura 37. Tabla de color para categorización de estados de maduración propuesta.**



**0:** Fruto verde, muy duro. **1:** Fruto verde oscuro, duro y sin brillo. **2:** Fruto verde, se encuentra aún duro y en un color verde oscuro, si se mantiene a temperatura ambiente el producto estará listo para su consumo en aproximadamente 3 días. **3:** El fruto se encuentra aún duro y el color se oscurece, desaparece el tono verde, si se mantiene a temperatura ambiente el producto estará listo para consumo en aproximadamente 2 días. **4:** El fruto se encuentra menos duro pero aun con cierta firmeza y el color es morado oscuro. **5:** El fruto es suave al tacto y de color morado oscuro casi negro, indicando que está en su punto de maduración adecuado y listo para su consumo.

El compuesto antifúngico dieno se encuentra en la piel y la pulpa de frutos inmaduros (epicarpio y mesocarpio), A los 1 a 3 días después de cosecha, en el epicarpio, en una concentración de 700 – 1230  $\mu\text{g/g}$  que equivale a unos 1600 $\mu\text{g/mL}$ , cantidad superior a la concentración necesaria para conseguir 50% de inhibición de la elongación del tubo germinativo en conidias de *C. gloesporioides* (450  $\mu\text{g/mL}$ ), A los 5 días después de cosecha la concentración del dieno en el epicarpio disminuye a aproximadamente 350  $\mu\text{g/mL}$  y a los 5 días adicionales, aproximadamente de 160  $\mu\text{g/L}$  (Prusky 1992). Esto explica la aparición de los primeros síntomas a los 3 – 4 ddi.

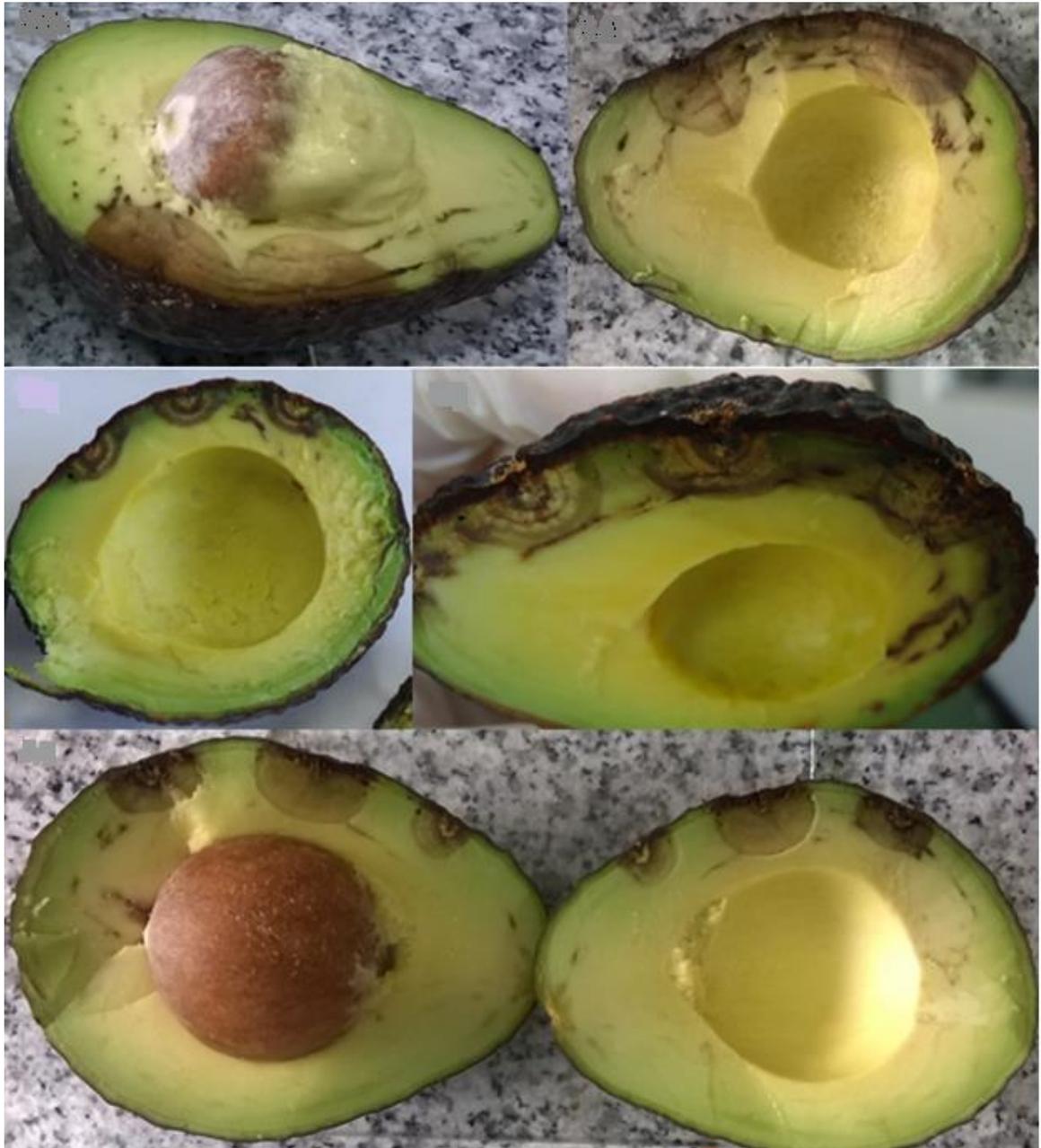
Los síntomas internos se caracterizan por ser lesiones que crecen de manera casi concéntrica al punto de inoculación. Estas lesiones varían de tonalidad, pudiendo ser de un color más o menos uniforme o estando configuradas por halos de colores marrones que se diferencian entre si y que se distribuyen igualmente de manera concéntrica radial al punto de la lesión. Estas últimas generalmente son lesiones de tipo corchoso

diferentes de las lesiones uniformes, las cuales suelen ser más blandas que el mesocarpio o en ocasiones poco más rígidas que este en su estado de madurez de consumo. Estos tipos de lesiones se presentaron de manera aislada en frutos diferentes, pero también de manera mixta en un mismo punto de inoculación; iniciando por ser una lesión corchosa con halos para cambiar a una lesión más blanda y de un solo tono en la medida que avanzo al interior del fruto (Figura 38).

Lo anterior sugiere que en el tipo de lesiones necróticas blandas y de tono uniforme, los frutos inoculados tuvieron niveles muy bajos de los compuestos antifúngicos dieno/trieno y la infección se dio sin mayor resistencia. Por su parte, en las lesiones rígidas, corchosas y distribuidas en forma de halos concéntricos, es posible que los frutos aun tuvieran concentraciones de dieno/trieno que les permitieran generar capas suberizadas como resistencia al patógeno, pero que a su vez no fueron lo suficientemente elevadas para detener por completo la infección.

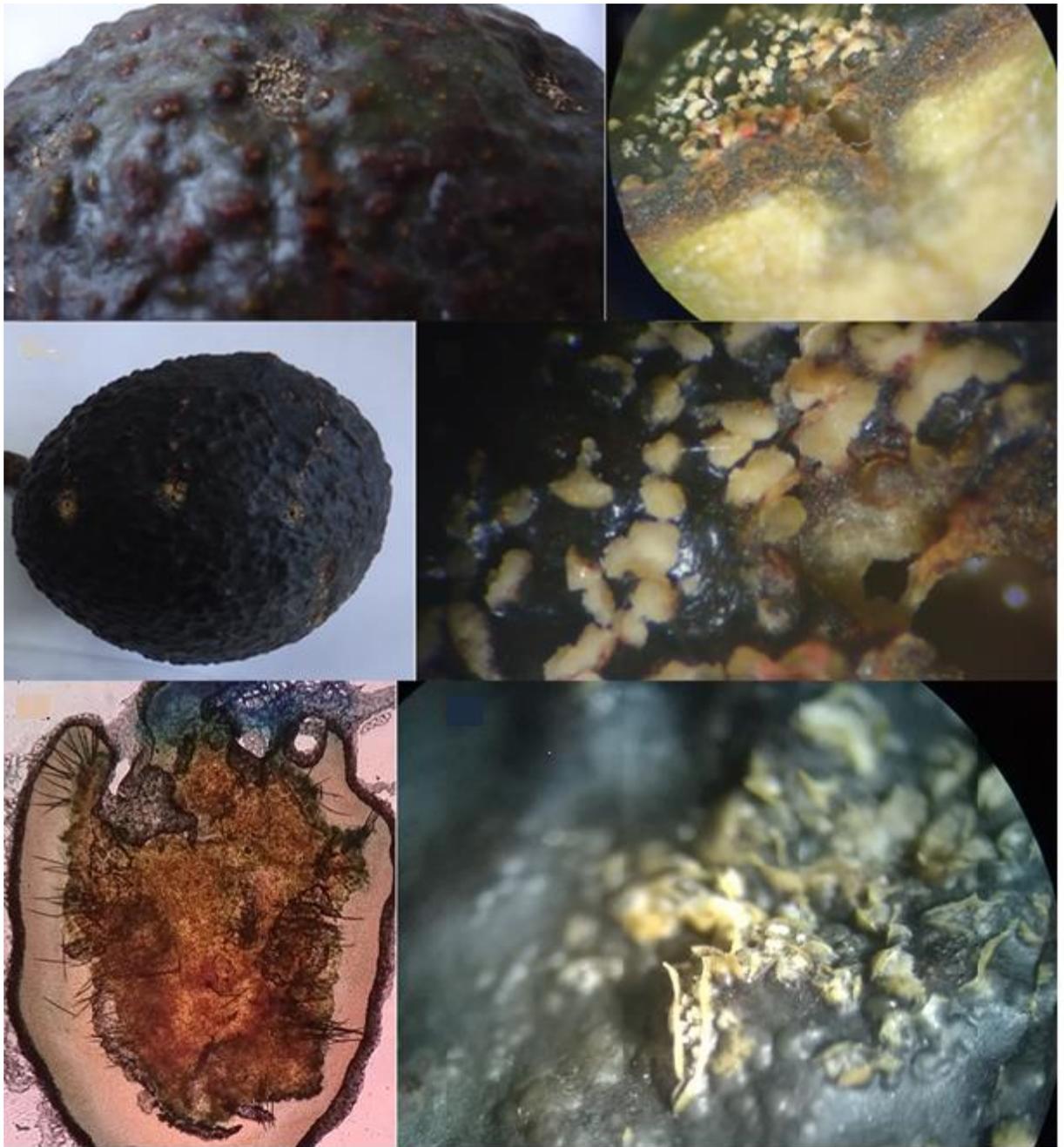
Los signos aparecen de manera evidente con mayor frecuencia a partir de los 5 - 6 ddi, en forma de acérvulos de estructuras granulares de tonos color salmón y crecen de manera concéntrica al punto de inoculación. Los crecimientos acervulares figuran generalmente enteros, pero también reventados habiendo expulsado la masa conidial que crece al interior. Al microscopio los acérvulos se observan de forma más o menos ovoide con bordes irregulares y con múltiples setas adheridas a su parte más externa (Figura 39).

**Figura 38. Tipos de síntomas internos a los 7ddi, corte longitudinal de frutos inoculados.**



**A y B, Lesiones homogéneas, C y D, Lesiones en forma de halos corchosos con variación de tonos, E, Lesiones mixtas,**

**Figura 39. Signos superficiales de la enfermedad expresados a los 7 ddi.**



**A, C y D,** Superficie del fruto con formación de acérvulos irregulares concéntricos al punto de inoculación. **B,** Corte longitudinal del fruto en el punto de inoculación. **E,** Acérvulo microscopio óptico 40x, **F,** Acérvulos reventados

Se encontró diferencia significativa en el área afectada cm<sup>2</sup> para los aislamientos como para el grado de madurez de los frutos y la interacción aislamiento por grado de madurez (Tabla 15). Este comportamiento ratifica que de acuerdo al grado de madurez del fruto se tiene mas predisponibilidad al daño por *Colletotrichum* spp.

**Tabla 15. Cuadrados medios para patogenicidad de *Colletotrichum* spp.**

Variable	Cuadrado medio
Aislamiento	11,369 **
Grado madurez	90,920 **
Aislamiento x Grado medio	2,9171 **

\* Nivel de significancia al 5%

\*\* Nivel de significancia al 1%

Según la prueba de rango múltiple de Duncan para Área de lesiones, los aislamientos fueron ordenados en 27 grupos homogéneos según su nivel de patogenicidad, siendo los 5 grupos más patogénicos correspondientes a las cepas 34 (grupo 1), 35 (grupo 2), 52 (grupo 3), 3 (grupo 4) y 33 (grupo 5) correspondientes a las muestras tomadas de los municipios: Roldanillo (aislamiento 34), Versailles (aislamiento 35), El Dovio (aislamiento 52), Sevilla (aislamiento 3) y La unión (aislamiento 33), (Tabla 16, Figura 40).

Según la agrupación realizada a partir de la prueba del rango múltiple de Duncan para la fuente de variación aislamientos en función de la variable de respuesta %IM media; se generaron 33 agrupaciones homogéneas, siendo los 5 grupos (con total de 12 aislamientos) más resistentes o menos susceptibles a los 6 productos en general correspondientes a los aislamientos: 53 (grupo 1), 45, 42, 55, 20, 4 (grupo 2), 24, 5, 1, 23, (grupo 3), 52 (grupo 4) y 18 (grupo 5), Aislamientos que pertenecen a los municipios de: Argelia (aislamiento 53, 45, 42, 55, 20, 23, 5 y 4), El Dovio (aislamiento 1 y 52), El Cairo (aislamiento 24) y Yotoco (aislamiento 18) (Figura 40).

**Tabla 16: Patogenicidad de las cepas en los municipios muestreados**

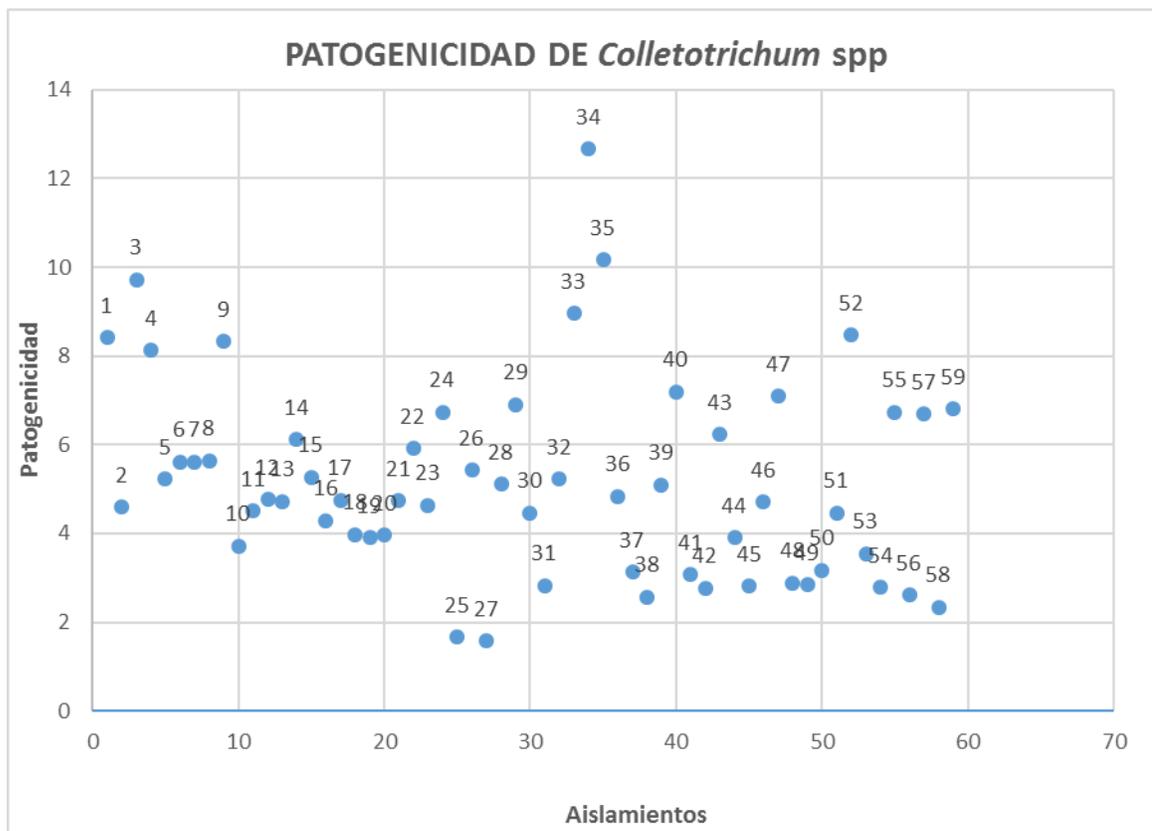
LOCALIDAD	PATOGENICIDAD		
	MEDIA	MINIMA	MÀXIMA
ARGELIA	4,69	2,77	8,12
BOLIVAR	4,90	2,78	7,18
CAICEDONIA	6,25	5,72	6,74
EL DOVIO	7,86	6,70	8,48
PALMIRA	3,23	1,57	5,22
RESTREPO	4,51	4,50	4,51
ROLDANILLO	6,70	4,29	12,68
SEVILLA	5,23	2,57	9,72.
TORO	3,18	1,66	4,46
LA UNIÒN	5,36	2,34	8,96
VERSALLES	5,01	2,62	10,16
YOTOCO	5,11	3,98	6, 24

La patogenicidad en las 59 cepas tuvo un promedio de 5,17, un valor mínimo de 1,57 y un máximo de 12,68; lo que significa que hay unas cepas que son poco patogénicas en comparación con otras muy patogénicas. El crecimiento radial promedio estuvo en 35,11 mm, un valor mínimo de 14,5 mm y un máximo de 42,5 mm. El ancho, la media estuvo en 5,35  $\mu\text{m}$ , un mínimo de 3,70  $\mu\text{m}$  y un máximo de 7,79  $\mu\text{m}$ . En el largo, la media fuè de 16,37  $\mu\text{m}$ , un mínimo de 10,27  $\mu\text{m}$  y un máximo de 22,68  $\mu\text{m}$ . Al compararlo con el histograma, la distribución de patogenicidad en la mayoría de las cepas está entre los valores de 2,5 cm y 6,5 cm.

En el crecimiento radial, hay unas cepas que tienen bajo crecimiento y que están entre 1 y 33 y las de mayor crecimiento entre 34 y 45 en un 28%. La mayoría de las cepas tuvieron un ancho de 4 a 6,5  $\mu\text{m}$  en un 29% de los casos y el largo está entre 15 y 19  $\mu\text{m}$ , con un 32%. Existe correlación entre largo y ancho de las cepas. La patogenicidad, no tiene relación con el crecimiento radial, ni con el ancho ni el largo, ni es más patogénica por poseer mayor crecimiento radial.

Algunas cepas pueden tener pocas conidias, pero ser muy virulentas. No hay correlación entre crecimiento, largo y ancho. El crecimiento radial está correlacionado con el ancho ( $r=0,31$ ) pero no con el largo. Entre largo y ancho si hay correlación positiva de ( $r=0,56$ ), lo que indica que más larga más ancha y si es más corta es más angosta, demostrando que hay una relación directamente proporcional. (Figura 40).

**Figura 40. Grados de patogenicidad de los aislamientos**



En la figura 40, se visualizan los grados de patogenicidad de cada una de los aislamientos, Patogenicidad baja (10, 25,27,31,37, 38,41,42,44, 45,48,49,50,54,56,58); Patogenicidad media (2,5,6,7,8,10,11,12,13,15,16,17,18,19,20,21,23,26,28,30,32, 36,39, 40,43,44,46,47,51, 52,55,57,59); Patogenicidad alta (1,3,4,9, 33,35, 52) y muy alta (34).

### **3.6 Control *in-vitro* de *Colletotrichum* spp**

El aguacate, en su manejo agronómico requiere de productos agroquímicos en el control fitosanitario de plagas y enfermedades. Colombia, país agrícola por excelencia, la aplicación de plaguicidas en los cultivos de frutas y hortalizas se ha convertido en una herramienta en la producción, pero su uso excesivo y sin control tiene riesgos potenciales para la salud y el ambiente, y su restricción para productos de exportación en relación a la inocuidad y sanidad, tienen que garantizar la salud y la vida de las personas, por lo que las medidas de control implican el uso de niveles máximos permitidos de residuos de plaguicidas. Nuestro ente gubernamental, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), se acoge a normas internacionales que facilitan la importación y exportación de productos agrícolas.

Actualmente existen registrados algunos productos para el control de *Colletotrichum* spp en aguacate, los cuales se evaluaron a nivel *in vitro* para los 59 aislamientos obtenidos en esta investigación, para el control en poscosecha de este patógeno, que se vió reflejado en la inhibición de crecimiento y respuesta en la morfología de cada una de las cepas evaluadas. A continuación, se detalla cada uno de estos eventos, a saber: Figuras 41 a 47.

Se encontró diferencia significativa entre los productos utilizados en la inhibición de *Colletotrichum* spp., así como en la inhibición presente en los diferentes aislamientos (Tabla 17).

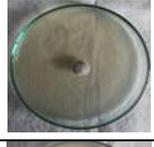
Tabla 17. Cuadros medios para inhibición de crecimiento

VARIABLE	CUADROS MEDIOS
Aislamiento	599,05**
Producto	283490,29**
Aislamiento * Producto	254,94**

\* Nivel de significancia al 5%

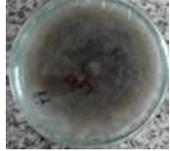
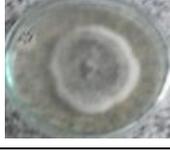
\*\* Nivel de significancia al 1%

Figura 41: Control *in vitro* Procloraz + Tebuconazole

CEPA	TESTIGO	R1	R2	R3
4				
11				
21				
44				
49				
53				

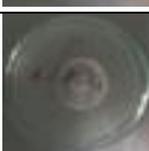
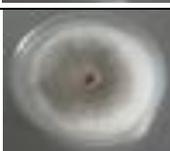
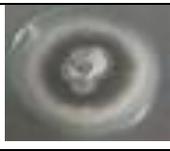
**Procloraz + Tebuconazole**, total inhibición de crecimiento para los aislamientos 4, 11, 21, 44, 49 y 53, durante los siete días de seguimiento, con una efectividad del 99,13%. Similar en las 59 cepas evaluadas en comparación con el testigo.

**Figura 42: Control *in vitro* con Azoxystrobin + Tebuconazole**

CEPA	TESTIGO	R1	R2	R3
44				
49				
53				

**Azoxystrobin + Tebuconazole**, inhibición parcial de crecimiento, durante los siete días de seguimiento, donde la respuesta dependía del aislamiento evaluado, con una efectividad del 85,52%.

**Figura 43: Control *in vitro* Flutriafol + Azoxystrobin**

CEPA	TESTIGO	R1	R2	R3
4				
11				
21				
44				
49				



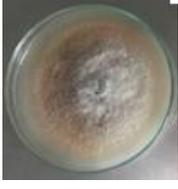
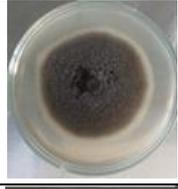
**Flutriafol + Azoxystrobin**, Para las 59 cepas evaluadas, el crecimiento de estas fue menor al testigo en todos los casos durante los siete días de evaluación, pero con comportamientos muy similares y una efectividad del 56,47%.

**Figura 44: Control *in vitro* Prochloraz**

CEPA	TESTIGO	R1	R2	R3
<b>4</b>				
<b>11</b>				
<b>21</b>				
<b>44</b>				
<b>49</b>				
<b>53</b>				

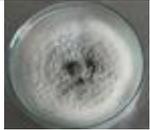
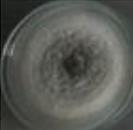
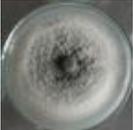
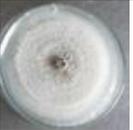
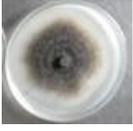
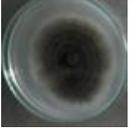
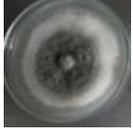
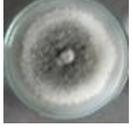
**Prochloraz**, Inhibición total del crecimiento de todos los aislamientos evaluados, durante los siete días de seguimiento, con una efectividad del 99,72%. Presentó cambios estructurales de importancia.

Figura 45: Control *in vitro* con Myclobutanil

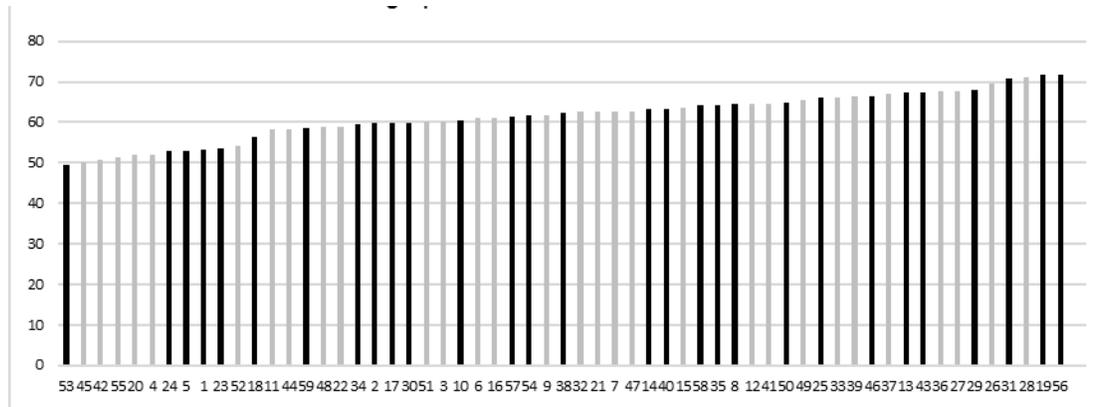
CEPA	TESTIGO	R1	R2	R3
4				
11				
21				
44				
49				
53				

**Myclobutanil**, El comportamiento en todos los aislamientos evaluados respecto al testigo fueron muy similares, con una efectividad del 18,33%. Presentó diferencias leves de crecimiento y estructurales en comparación con el testigo.

**Figura 46: Control *in vitro* con Sulfato de Cobre Pentahidratado**

CEPA	TESTIGO	R1	R2	R3
4				
11				
21				
44				
49				
53				

**Sulfato de Cobre Pentahidratado**, la utilización de este ingrediente activo no inhibió el crecimiento de ninguna de las 59 cepasevaluadas, no se presentaron cambios estructurales de relevancia, durante los siete días de seguimiento, en comparación con el testigo,

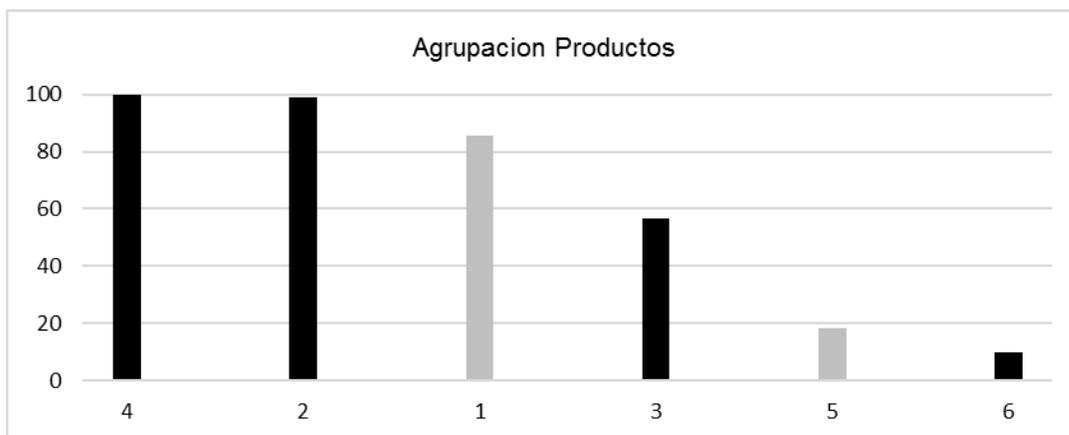
**Figura 47. Agrupación Duncan para aislamientos según la variable %IM medio**

Colores iguales consecutivos representan grupos homogéneos de aislamientos según su grado medio de % IM, Eje X Aislamiento, eje Y % IM medio,

**Fuente:** G.M. Cobo N.; M. A. García D. y C. Domínguez P., 2016

De la misma manera que en la agrupación de los aislamientos, mediante la prueba del rango múltiple de Duncan, se consiguió generar 5 agrupaciones homogéneas para la fuente de variación, productos que al ordenarlos de mayor a menor según su efectividad medida con la variable % IM medio se listan de la siguiente manera: Prochloraz (99,72%) y Prochloraz + Tebuconazole (99,13%) en primer lugar sin diferencia significativa entre sí, seguidos por Azoxystrobin + Tebuconazole SC (85,52%), Azoxystrobin + Flutriafol (56,47%), Myclobutanil (18,33%) y en último lugar Sulfato de Cobre pentahidratado (9,88%), (Figura 48).

**Figura 48. Agrupación Duncan para productos según valor medio de la variable % IM medio**



Colores iguales consecutivos representan grupos homogéneos de productos según su grado medio de % IM, Eje X Productos, eje Y %IM medio, **1.** Azoxystrobin + Tebuconazole **2.** Tebuconazole + Prochloraz, **3.** Azoxystrobin + Flutriafol, **4.** Prochloraz, **5.** Myclobutanil, **6.** Sulfato de cobre pentahidratado,

**Fuente:** G.M. Cobo N.; M. A. García D. y C. Domínguez P., 2016

### 3.6.1 Efectos estructurales de los fungicidas sobre los aislamientos

Los efectos estructurales de los fungicidas en los aislamientos escogidos al azar consistieron en deformaciones acompañadas de engrosamiento del micelio para los 6 productos evaluados debido a que 5 de los 6 evaluados tenían mecanismos de acción relacionados con la inhibición de la biosíntesis de ergosterol (triazoles e imidazoles) haciendo que la membrana colapse y deje de ser una barrera selectiva en el intercambio de elementos entre el citoplasma y el exterior celular (Figuras 49 a 55).

Estos triazoles e imidazoles poseen estrategias que alteran o bloquean la biosíntesis del ergosterol afectan la permeabilidad de la membrana celular y la actividad de las enzimas enlazadas a dicha membrana, lo que conduce a la inhibición del crecimiento y, posteriormente, a la muerte celular (Trigos y Ortega-Regules 2002).

Para los 59 aislamientos de *Colletotrichum* spp., se evaluaron seis (6) fungicidas para su control, que cuentan con registro ICA, para productos de exportación. Cada producto se evaluó con tres repeticiones de la dosis recomendada y usada, siendo las dosis evaluadas para cada caso las descritas en la table 7.

En los ensayos de sensibilidad *in vitro* algunos productos inhibieron el crecimiento de los 59 aislamientos evaluados en diferentes porcentajes, dependiendo del ingredient active y su efecto sobre la morfología de los aislamientos evaluados, mostró las diferentes estructuras afectadas, frente al producto evaluado.

Entre los fungicidas evaluados, el Procloraz y el Procloraz + Tebuconazole, mostraron los mejores porcentajes de inhibición frente a cada uno de los aislamientos evaluados, ya que inhibió en un 99.72% y 99,13% respectivamente el desarrollo de las 59 cepas. La actividad fungistatica de Azoxystrobin + Tebuconazole, present un porcentaje de inhibición del 85.52%, seguido de Azoxystrobin + Flutriafol con un 56.47%.

Los porcentajes más bajos registrados corresponden a Myclobutanil con un 18,33% y sulfato de cobre Pentahidratado con un 8,88%, que para efectos de control de éste patógeno en los 59 aislamientos es ineficiente.

La susceptibilidad de *Colletotrichum* spp se vió reflejada hacia los Imidazoles, que son los encargados de la biosíntesis del ergosterol, ya que inhibin la dimetilación del sterol, produciendo la inhibición del crecimiento de las cepas evaluadas; seguido de Triazoles + Imidazoles (Tebuconazole + Proclhoraz), que inhibe la biosíntesis del ergosterol, interfiriendo en lla inhibición de las menbranas celulares. La mezcla de estrobirulinas + Triazoles (Azoxystrobin + Tebuconazole), afectan el patógeno, ya que interfieren en la respiración mitocondrial y la biosíntesis del ergosterol.

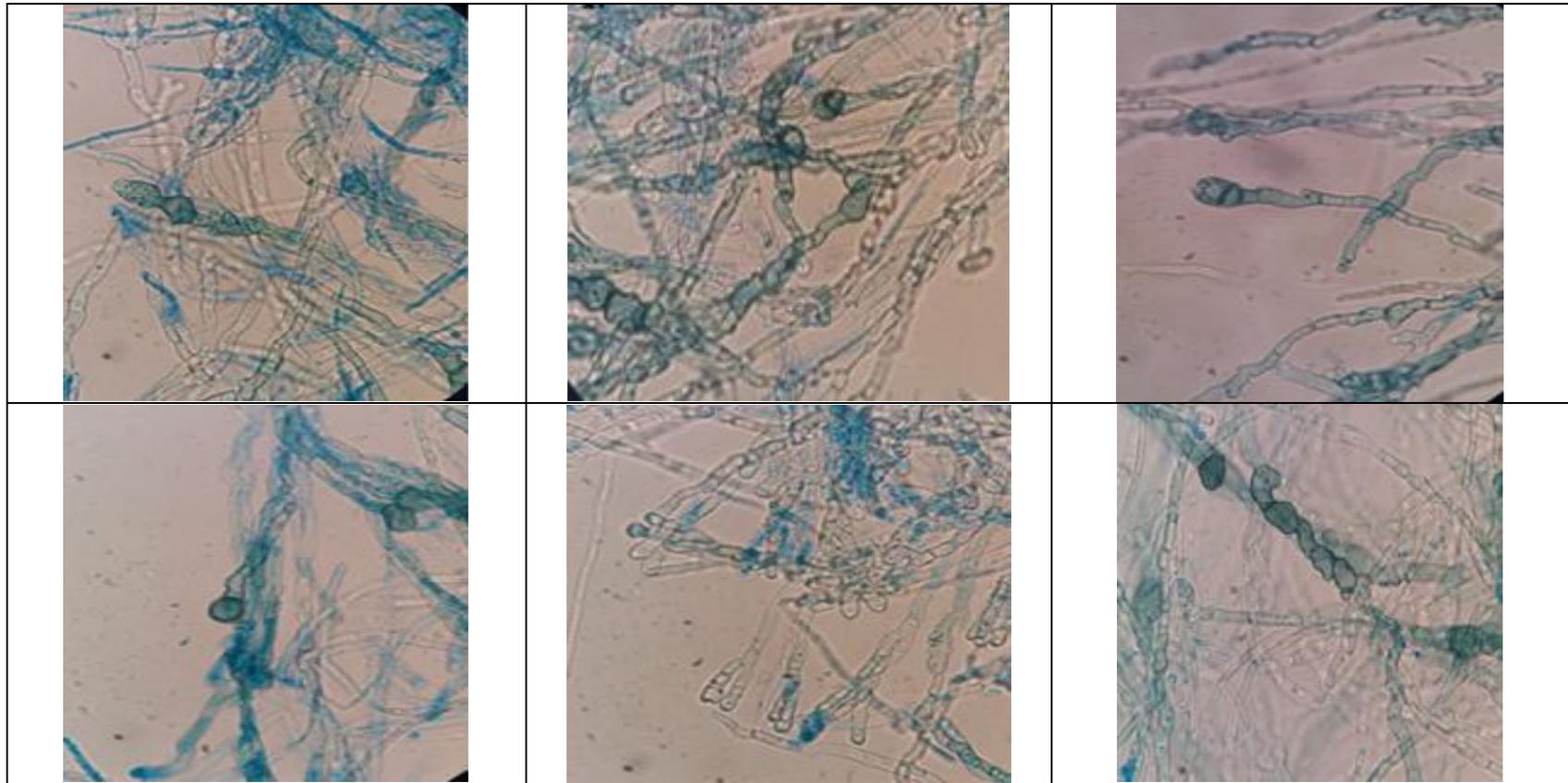
El efecto de una inhibición media se pudo determinar con Estrobirulina + Triazole (Azoxystrobin + Flutriafol), pero que a pesar de que inhibe la respiración mitocondrial y formación del ergosterol, su efecto sobre los aislamientos evaluados no dió la eficacia esperada.

El Triazol Myclobutanil, reportado como inhibidor de la biosíntesis del ergosterol, su efectividad es muy baja en el control o inhibición de las 59 cepas de *Colletotrichum* spp . Los compuestos de cobre, como el sulfato de cobre pentahidratado, no mostraron inhibición satisfactoria para ninguna de las cepas evaluadas; sin embargo, estos productos pueden considerarse como una alternativa de uso preventivo más no curative en las aplicaciones a éste cultivo y que deben realizarse en prefloración, floración y cuajamiento de frutos.

Fungicidas que se usan de manera excesiva en los cultivos, pueden mostrar resistencia al producto fúngico en algún momento, debido a que por su manejo se van seleccionando cepas resistentes.

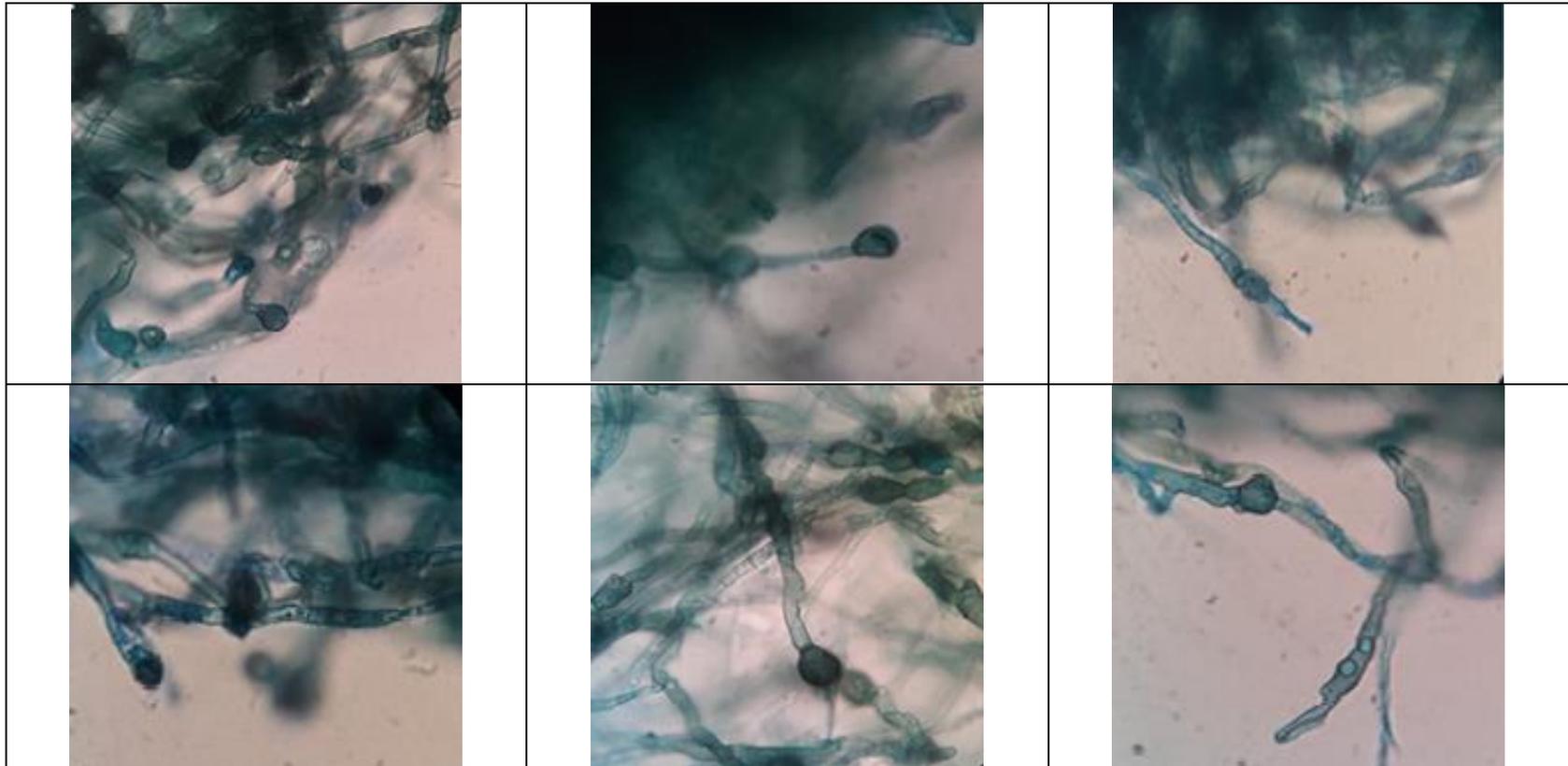
Por lo anterior, la rotación de fungicidas según su mecanismo de acción e ingrediente activo, es una alternativa a tener en cuenta, ya que contribuye a que se afecten diferentes procesos bioquímicos y /o fisiológicos de éste patógeno en particular.

**Figura 49. Respuesta morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp al producto Azoxystrobin + Tebuconazole**



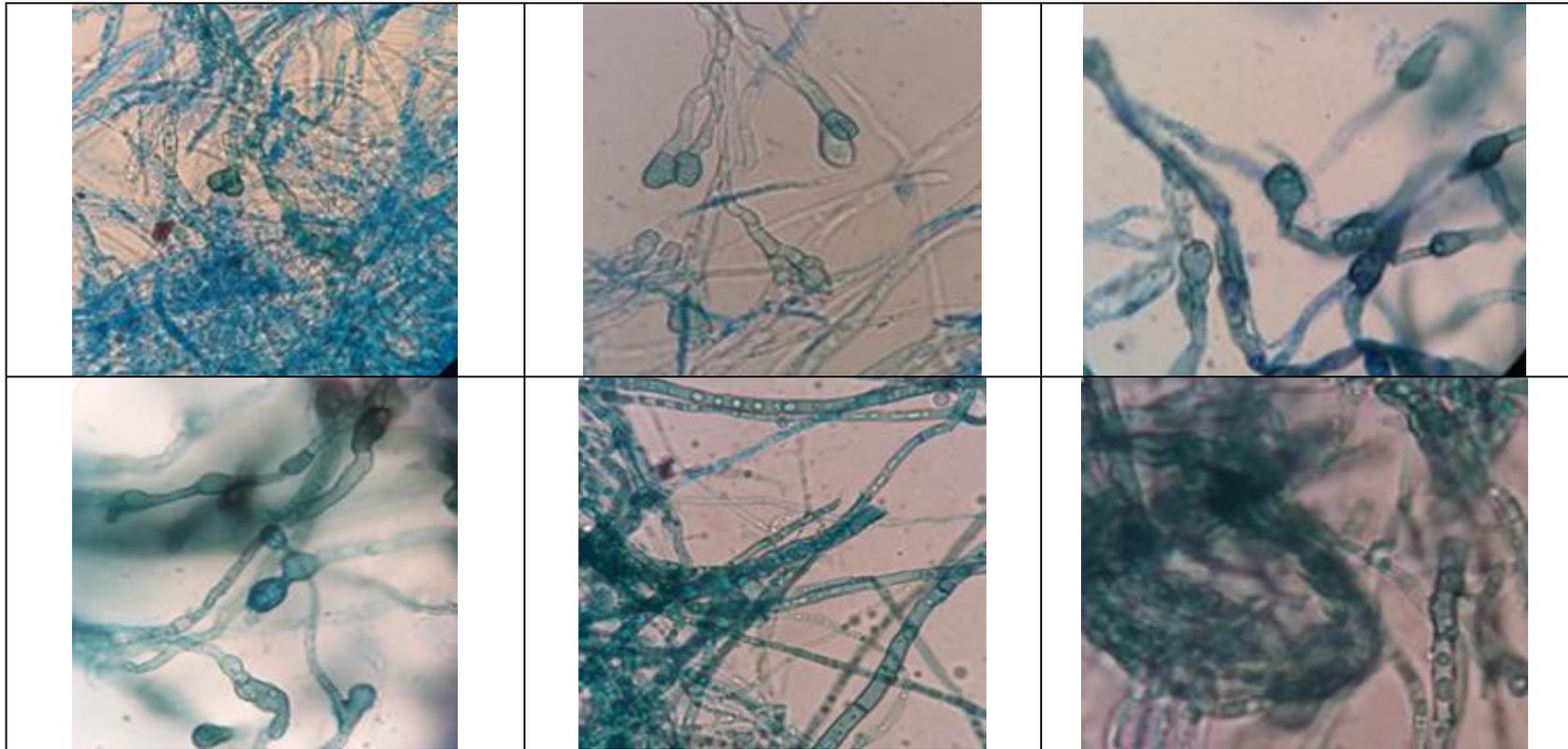
**A.** Aislamiento 4, **B.** Aislamiento 11, **C.** Aislamiento 21, **D.** Aislamiento 44, **E.** Aislamiento 49 y **F.** Aislamiento 53  
Para los aislamientos evaluados se puede observar la proliferación de apesorios con acortamiento de micelio, en respuesta al producto Azoxystrobin + Tebuconazole

**Figura 50: Respuesta morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp al producto Tebuconazole + Prochloraz**

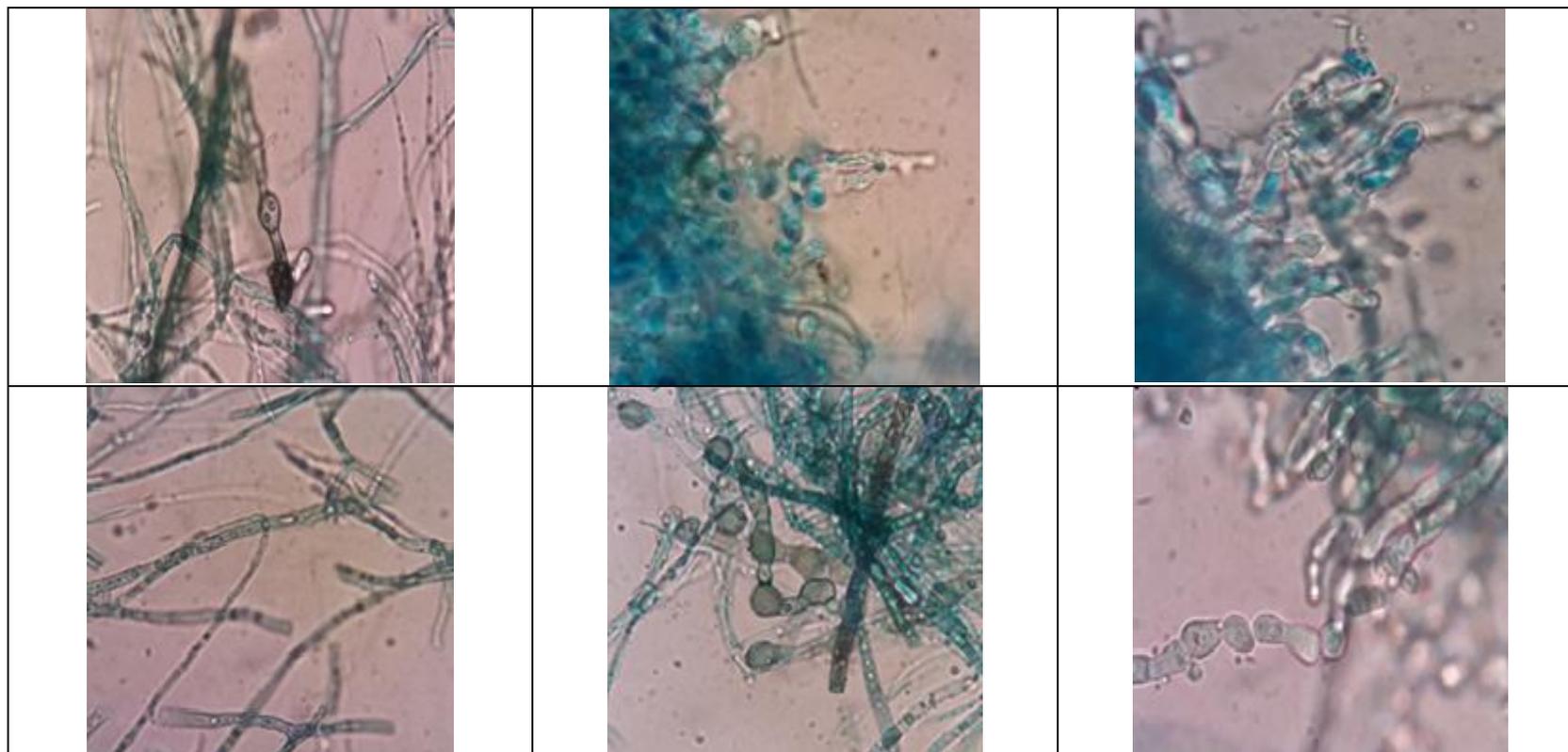


**A.** Aislamiento 4, **B.** Aislamiento 11, **C.** Aislamiento 21, **D.** Aislamiento 44, **E.** Aislamiento 49 y **F.** Aislamiento 53. Para todos los aislamientos se observa proliferación de apresorios y oscurecimiento de tejidos, en respuesta a la aplicación del producto Tebuconazole + Prochloraz.

**Figura 51. Respuesta morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp al producto Azoxystrobin + Flutriafol**

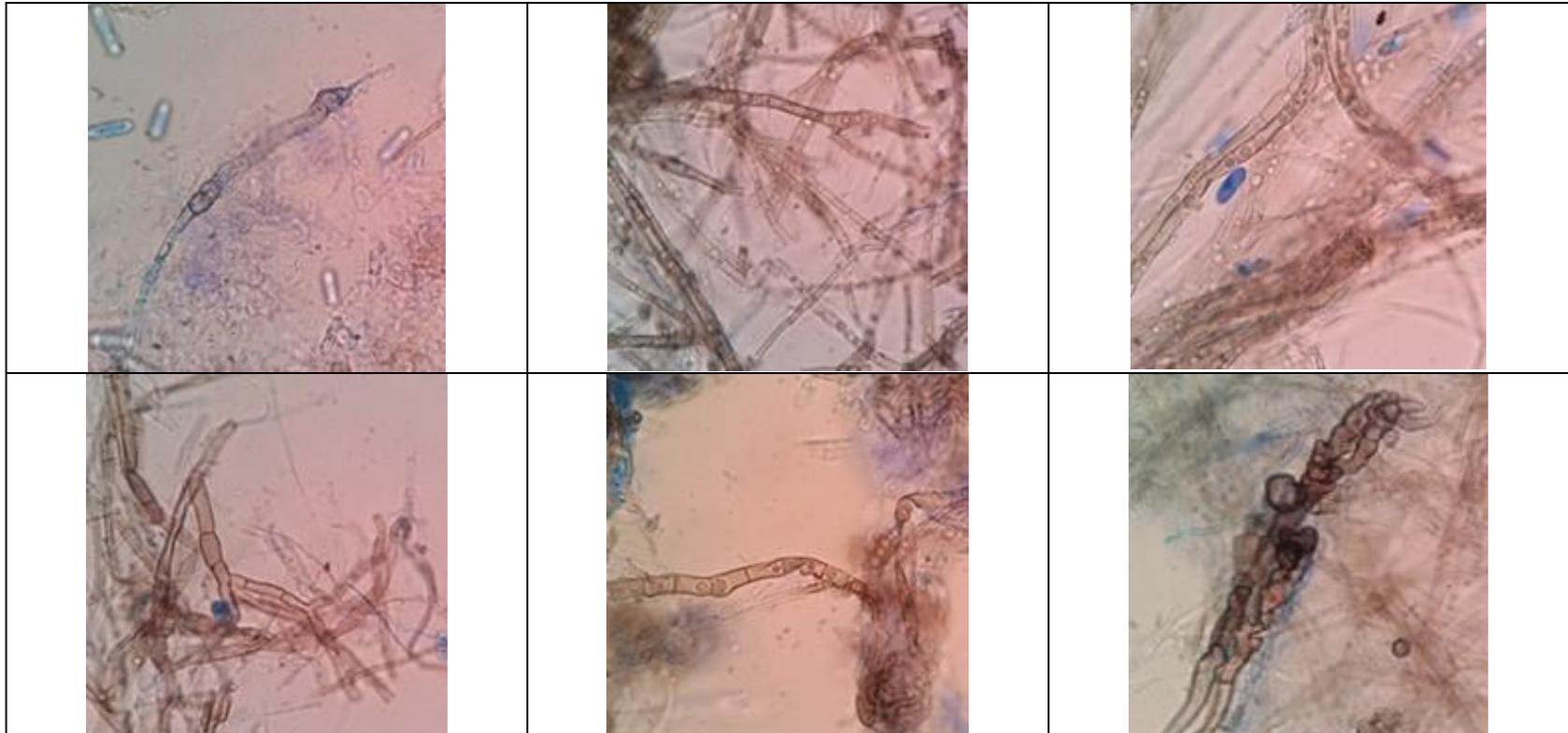


**A.** Aislamiento 4, **B.** Aislamiento 11, **C.** Aislamiento 21, **D.** Aislamiento 44, **E.** Aislamiento 49 y **F.** Aislamiento 53. Para todos los aislamientos evaluados se presentó proliferación de apresorios, acortamiento y deshidratación de micelio

**Figura 52. Respuesta morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp al producto Prochloraz**

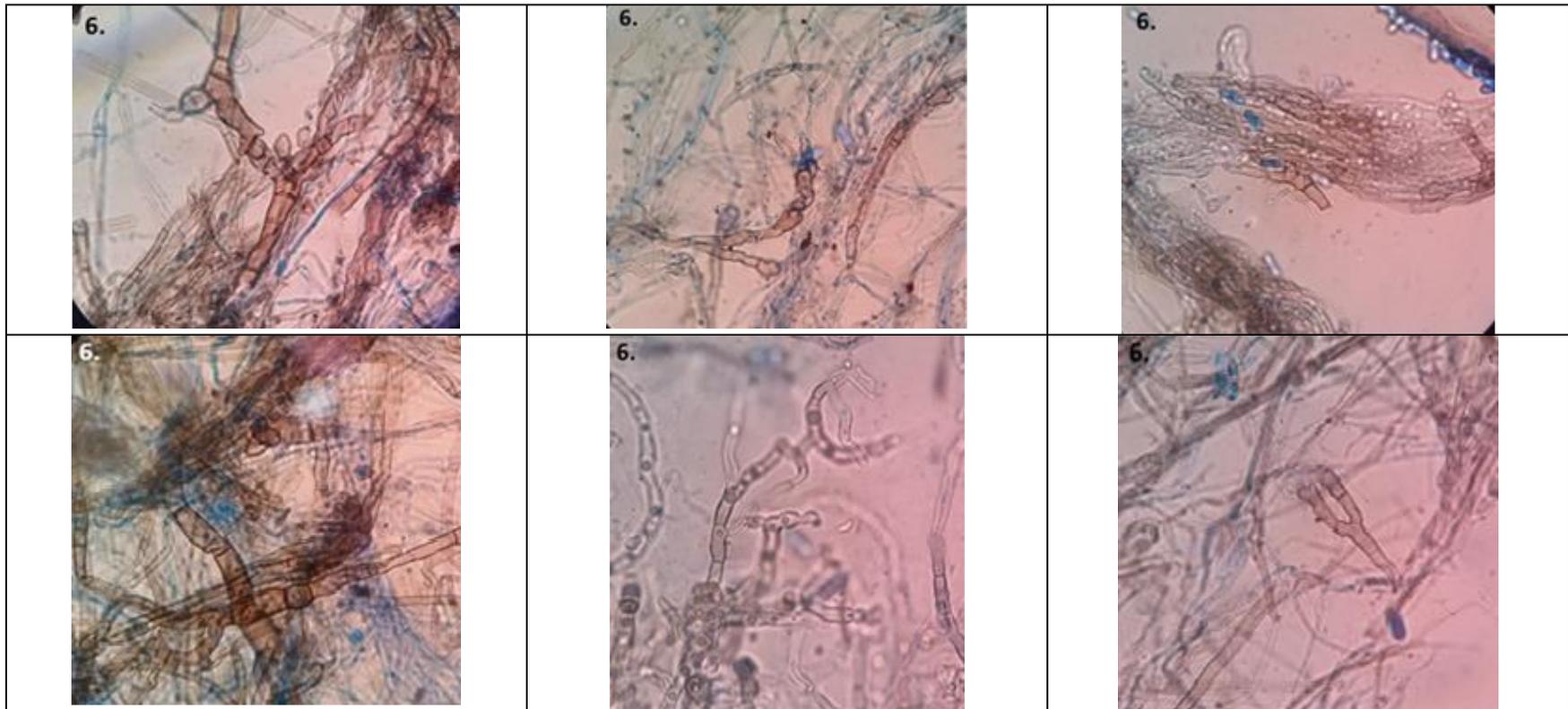
**A.** Aislamiento 4, **B.** Aislamiento 11, **C.** Aislamiento 21, **D.** Aislamiento 44, **E.** Aislamiento 49 y **F.** Aislamiento 53. Para todos los aislamientos evaluados se presentó proliferación de apresorios en algunos de los aislamientos evaluados, con acortamiento, oscurecimiento y engrosamiento de micellio con el producto prochloraz.

**Figura 53.** Respuesta morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp al producto Myclobutanil



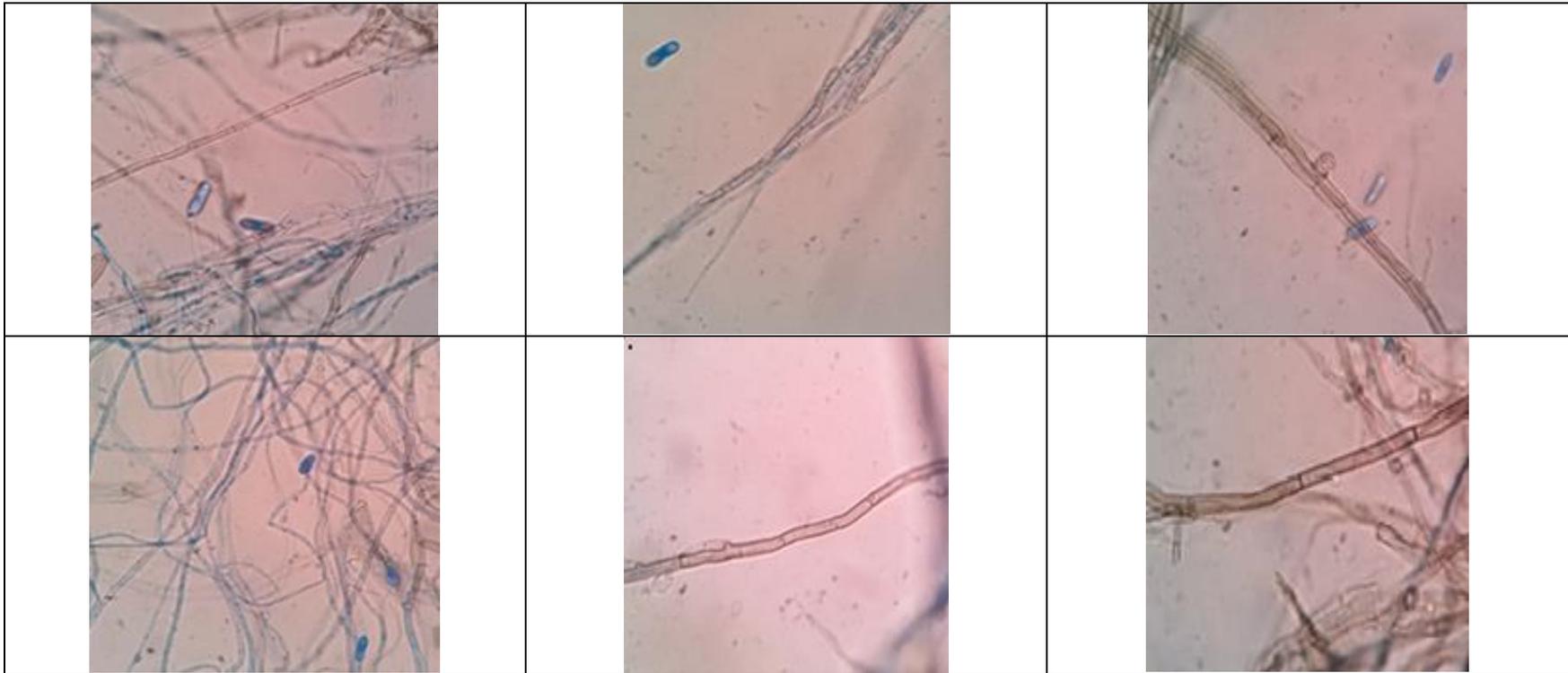
**A.** Aislamiento 4, **B.** Aislamiento 11, **C.** Aislamiento 21, **D.** Aislamiento 44, **E.** Aislamiento 49 y **F.** Aislamiento 53. Para los 59 aislamientos evaluados se observa maduración de hifas, acortamiento de entrenudos y algunos presentaron formación de conidios.

**Figura 54. Respuesta morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp al producto Sulfato de cobre pentahidratado**



**A.** Aislamiento 4, **B.** Aislamiento 11, **C.** Aislamiento 21, **D.** Aislamiento 44, **E.** Aislamiento 49 y **F.** Aislamiento 53. Para los 59 aislamientos evaluados se observó maduración de Micelio acortamiento y engrosamiento de tejidos.

**Figura 55. Respuesta morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp Testigo en PDA**



**A.** Aislamiento 4, **B.** Aislamiento 11, **C.** Aislamiento 21, **D.** Aislamiento 44, **E.** Aislamiento 49 y **F.** Aislamiento 53. Para los 59 aislamientos evaluados, se observó crecimientos de micelio y proligeración de conidios.



## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

La caracterización morfológica permitió determinar diversidad en formas con características morfológicas diferentes, tales como oblongas, elípticas, fusiformes y arriñonadas, con tamaños comprendidos entre 22,68 y 10,27  $\mu\text{m}$  de largo y ancho entre 7,79 y 3,70  $\mu\text{m}$  ; y diversidad de colores y tonalidades (blancos, rosados, grices, etc.).

En la caracterización molecular los resultados muestran que el 45,8% amplifican positivamente para *Colletotrichum gloeosporioides* y el 23,7% para *Colletotrichum acutatum* con un peso molecular aproximado de 490 bp y 500 bp respectivamente. Para las demás secuencias de genes se observa que 28 aislamientos amplifican para ACT, 54 para CHS, 52 para GD, 25 para TUB y 11 para CAL, indicando la amplia diversidad de especies registradas y razas del patógeno en el Valle del Cauca, la cual se determinó mediante secuenciación de ADN. Para algunos aislamientos no se encontró especificidad en los marcadores utilizados, lo que no permitió la clasificación a nivel de especie.

Todos los aislamientos tienen diferente grado de patogenicidad, encontrándose con valores entre 12,68 y 1,66.

El grado de madurez de los frutos tiene una relación directamente proporcional con el nivel de infección conseguido a los 7 ddi, donde a mayor grado de madurez, mayor fue la velocidad de infección y desarrollo de la enfermedad sobre los frutos inoculados; fenómeno que se le atribuye a la degradación de los compuestos antifúngicos que tiene naturalmente el fruto

En las evaluaciones sobre la patogenicidad se encontraron 27 variaciones patogénicas y 33 variaciones de susceptibilidad en los 59 aislamientos evaluados, para los 6 productos químicos utilizados como alternativa de control.

Las 5 agrupaciones o variantes que mostraron ser los más patogénicos estuvieron compuestas por 5 aislamientos que corresponden a los municipios de: Roldanillo (1), Versalles (1), El Dovio (1), Sevilla (1) y La Unión (1).

Los mejores controles se obtuvieron con los fungicidas Prochloraz 450g/L y Tebuconazole 133g/L + Prochloraz 267g/L en dosis de 600cc/Ha y 540 cc/Ha respectivamente, siendo el grupo de productos que mostraron el mejor comportamiento para el control *in vitro* de los aislamientos evaluados (superior al 90%), seguido de Azoxystrobin 120g/L + Tebuconazole 200g/L, con menor efectividad y porcentaje de control cercano al 85%. Los menores resultados se obtuvieron con Azoxystrobin 125g/L + Flutriafol 125g/L con porcentaje de control cercano al 55%; Myclobutanil 400g/Kg con 17% aproximadamente y Sulfato de cobre pentahidratado 60g/L con porcentaje de control cercano al 10%.

## 4.2 Recomendaciones

Se sugiere posteriores estudios con otros primers para identificar nuevas especies, razas o clados que categorizen algunos de los aislamientos que no pudieron llegar a identificarse a nivel de especie en este estudio.

Evaluar otras alternativas de control del patógeno, que tengan otros sitios o modos de acción diferentes.

Dentro de la cadena productiva de este importante renglón se sugiere el acompañamiento institucional que asegure el adecuado manejo fitosanitario, garantizando la calidad e inocuidad del producto y que asegure el valor agregado al producto de exportación.

## 5. Bibliografía

**Adama.** Ficha técnica. RSCO-FUNG-0357-321-013-021

**Adama,** 2015. Ficha técnica. Registro Nacional ICA No. 904.

**Adama,** 2015. Ficha técnica. Registro Nacional ICA No. 442.

**Adama,** 2014. Ficha técnica. Registro Nacional ICA No. 1169.

**Afanador, L., Gonzales, A., Gañan, L., Mejía, J., & Álvarez, E.,** 2014 abril 21.

*Characterizacion of the Colletotrichum species causing anthracnose in Andean Blackberry in Colombia.* Plant disease 98: 1503-1513, 2016 mayo 14, de APS Journals.

**Agronet,** Consultado Octubre, 2016. Disponible en:  
<http://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Colombia-est%C3%A1-cada-vez-m%C3%A1s-cerca-de-lograr-exportaci%C3%B3n-de-aguacate-hass-a-EE-UU--24-de-junio-de-2016.aspx>

**Álvarez, E., Ospina, C, A., Mejía, J, F., & Llano, G, A,** 2004. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle de Cauca. Fitopatol, Colom, 28, 1-8.

**Agrios G,N,** 1996. Fitopatología, México, 2 edición, Limusa, 838p.

**Agrios, G,N**, 2005. Plant Pathology. 5th edition. Academic Press, New York, USA. 992 p.

**Alfonso D, y Sandoval E**, 2008. Evaluación “*in vitro*” de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento. Trabajo de grado para optar al título de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias.

**Álvarez,, Ospina,, Mejía,, Llano, E**, 2007, Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloesporoides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Fitopatología Colombiana, (Volumen 28 número 1), 2. Retrieved from, [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos\\_ciat/Caract\\_colletotrichum%20EAlvarez1%20\\_2.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/Caract_colletotrichum%20EAlvarez1%20_2.pdf)

**Armstrong-Cho, C. & Banniza, S**. 2006, *Glomerella truncata* sp. Nov., the teleomorph of *Colletotrichum truncatum*. Mycological Research, 110(8), 951-956. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2006.06.002>

**Asohofrucol**, Marzo 9, 2015. Aguacate Hass, el oro de las frutas. Abril 3, 2016, de Asohofrucol Sitio web [http://www.frutisitio.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=21:aguacate-hass-el-oro-de-las-frutas&catid=24&Itemid=546](http://www.frutisitio.com/index.php?option=com_content&view=article&id=21:aguacate-hass-el-oro-de-las-frutas&catid=24&Itemid=546)

**Ávila -Quezada G., Teliz-Ortiz D., González-Hernández H., Johansen-Naime R., Vaquera- Huerta H.**, 2009. La roña, antracnosis y año por trips en aguacate, su distribución espacio temporal., Granada, España: Placido Cuadros.

- Ávila-Quezada, G., Silva-Rojas, H.V. Téliz-Ortíz, D.,** 2007. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. Plant Disease 91(9):1200 Abs.
- Baiza, V. H.** 2003. Guía Técnica del Cultivo del Aguacate. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Programa MAG–Frutales. La Libertad, El Salvador.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter,** 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th edition. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Bartoli, A., & Angel, J.** 2008. Manual Técnico del Cultivo de Aguacate Hass (*Persea americana* L.) (No. Bajados de Internet/2013), FHIA.
- Barreño F.** Estado actual y perspectivas de la cadena del aguacate en Colombia, Ministerio de Agricultura, Colombia.
- Barrientos, P. A. F.** ,2010. El aguacate. CONABIO, Biodiversitas, 88, 1-7.
- B., Joyce, P., Lisa, B., & Elaine, S.,** 2014. Marzo 14, Characterization of *Glomerella* Strains Recovered from Anthracnose Lesions on Common Bean Plants in Brazil. Journal pone, 90910, 371-438, 2016. Abril 3., De Plos One Base de datos.
- Bernal Estrada, J. A., & Díaz Díez, C. A.,** 2005. Tecnología para el cultivo del aguacate. Manual Técnico.
- Bernal, E., & Diaz, D.,** 2008. Tecnología para el Cultivo del aguacate. Abril 3 , 2016, de CORPOICA, Sitio web: <https://www.google.com.co/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=Bernal+E.,+J.A.,+D%C3%ADaz+DCA+2008,+Tecnolog%C3%ADa+para+el+cultivo+de+aguacate,+CORPOICA+%E2%80%93+centro+de+investigaci%C3%B3n+la+selva,+Rio+Negro,+Antioquia,+Co>

- Bernal, J.A.**, 2011. Cuarto informe de avance del proyecto: Estudio y evaluación del comportamiento agronómico y productivo de las variedades de aguacate Hass en diferentes pisos térmicos del departamento de Antioquia. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia. Medellín, 53 p.
- Prihastuti, H., Cai, I., Chen, H., McKenzie, E. H. and Hyde, K.D.**, 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity*, 39, 90-97.
- Botero, M.J.**; 2001. Interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz y Sacc., agente causal de antracnosis en tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* (Cav.) Sendt.). Manizales, 184p. Tesis de Magister en Fitopatología, Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Cannon, P, F., Damm, U., Johnston, P, R., & Weir, B, S**, 2012, *Colletotrichum*—current status and future directions, *Studies in Mycology*, 73, 181-213,
- Cárdenas Soriano, E., et al.**, 2001. Anatomía del daño por rozamiento y por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz En fruto de aguacate “Hass”. *Agrociencia* marzo-abril, año/vol, 35, No. 002. Colegio de Posgraduados Texcoco México, pp327-244.
- Castellanos, G., Jara, C. and Mosquera, G.** 2011. Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. CIAT.
- Centis S.I., Guillas N., Séjalon M.T., Esquerré-Tugayé.** 1997. Endopolygalacturonase Genes from *Colletotrichum*: Cloning of *clpg2* and comparison of its expression to that of *clpg1* saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular plant microbe interactions*, 10:769-775.

- Cheminova Agro de Colombia S.A.**, 2015. Ficha Técnica. Registro Nacional ICA No. 995.
- Coates, L.M., Stirling, A.M., Cooke, A.W. y Cannon. K.T.**, 1995, Biological control of avocado anthracnose, In: McCarthy, A, (ed,) Proceedings of the Australian Avocado Growers' Federation Conference 'The Way Ahead'. Department of Agriculture, Western Australia. pp, 115–119.
- Coleman, A. W.** (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons, *TRENDS in Genetics*, 19(7), 370-375.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA**, 2013, Actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas (BPA) en el cultivo de aguacate, 407p.
- Damm, U., Cannon, P, F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W.** 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*. 73, 37-113.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., Johnston, P. R., Weir, B. S., Tan, Y., P., & Crous, P. W.** 2012, The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*. 73, 1-36.
- Dow AgroSciences de Colombia S.A. LLC.**, 2013. Ficha técnica. Registro Nacional ICA No. 2697.
- FRAC Code List** ,2017.
- Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., & Shabi, E.** 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*. 90(6), 608-614

- Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E.** 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(3), 1014-1020.
- Ferreira T., Rasband W.** ImageJ/Fiji 1,46 user guide. 2012. [ en linea ], Colombia: [consultado enero,, 2016], Disponible en internet: <<http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>>.
- Gañán, L., Álvarez, E., & Castaño-Zapata, J.,** (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp, causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(152), 339-347.
- Gardes, M., & Bruns, T. D.** (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.
- Gaspar, L. F.** 2017. Resistencia a fungicidas. *Tecnoagro, La revista diferente*, No, 14.
- Giaretta, D. R., Bogo, A., Coelho, C. M. M., Guidolin, A. F., Dantas, A. C. D. M., & Gomes, E. A.** 2010. ITS-rDNA phylogeny of *Colletotrichum* spp, causal agent of apple glomerella leaf spot. *Ciência Rural*, 40(4), 806-812.
- Guetsky, R., Koliber I., Wang, X., Perlman, N., Gollop, N., Avila-Quezada, G., Hadar, I., and Prusky, D.** 2005. Metabolism of the flavonoid epicatechin by laccase of *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on pathogenicity on avocado fruits. *Phytopathology* 95:1341-1349.
- Hartill, W.F.T.** 1991. Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 19, 297–304.
- Hernandez López, A.** 2009. Caracterización patológica de cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, aisladas de aguacate (*Persea*

*americana* Mill). Anona (*Annona* sp) y servicios realizados en la estación ICTA-CISUR-CUYUTA, MASAGUA, ESCUINTLA. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de agronomía, Área integrada, Guatemala, 110p.

**Hernández-Lauzardo, A. N., Campos-Martínez, A., Velázquez-del Valle, M. G. Flores-Moctezuma, H. E., Suárez-Rodríguez, R., & Ramírez-Trujillo, J. A.** 2015. First report of *Colletotrichum godetiae* causing anthracnose on Avocado in Mexico. *Plant Disease*, 99(4), 555-555.

**Hernandez-Lauzardo, A. N., Campos-Martínez, A., Velazquez-Del Valle, M. G. Flores-Lardner, R., Johnston, P. R. Plummer, K. M. & Pearson, M. N.** 1999, Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato, *Mycological Research*, 103(03), 275-285.

**ICA**, 2012. Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill) – Medidas para la temporada invernal. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getattachment/4b5b9b6f-ecfc-46e1-b9ca-b35cc1cefee2/-nbsp;Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Aguacate.aspx>

**Kobiler I. Prusky D., Midland S. Sims J.J., Keen N.T.** 1993. Compartimentación de compuestos antifúngicos en las células de aceite de aguacate fruta mesocarpio y sus efectos sobre la susceptibilidad a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43, 319–28.

**Krebs, J. E., Lewin, B., Goldstein, E. S., & Kilpatrick, S. T.** 2014. *Lewin's genes XI*, Jones & Bartlett Publishers.

**Lardner, R., Johnston, P. R., Plummer, K. M., & Pearson, M. N.** 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. *Mycological Research*, 103(03), 275-285.

- Manandhar, J.B., Hartman, G.L. and Wang, T.C.** 1995. Conidial germination and apressorial formation of *Colletotrichum capsici* and *C. gloesporioides* isolates from pepper. *Plant Dis*, (76): 361–366.
- Marulanda, M, L., Isaza, L., & Ramírez, A. M.** 2007. Identificación de la especie de *Colletotrichum* responsable de la antracnosis en la mora de castilla en la región cafetera, *Scientia et Technica*, 13(37), 585-590.
- Mesa C. N., et al.** 2014. Programa de manejo fitosanitario en aguacate en el departamento del Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Facultad de ciencias agropecuarias, 55, 56p.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.** Consultado octubre, 2016. Disponible en: <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/El-aguacate-Hass.aspx>
- Moctezuma, H. E., Suárez-Rodríguez, R., & Ramírez-Trujillo, J. A.** 2015. First report of *Colletotrichum godetiae* causing anthracnose on avocado in Mexico. *Plant Disease*.
- Molano, P. J. T.** 2012. Enfermedades del Aguacate.
- Montealegre F.** Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Climatología. Dirección Nacional de Innovación académica. [http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/sedes/palmira/5000134/contenido/cap4/lec2,htm](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/sedes/palmira/5000134/contenido/cap4/lec2.htm)
- Morales J., Azpíroz H. y Pedraza H.** 2009. Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Colletotrichum gloesporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Michoacán, México. *Revista UDO Agrícola* 9 (4): 848-856, 2009.

- Mordue, J. E. M.** 1971. *Glomerella cingulata*. In: C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 315. Commonwealth Agriculture Bureaux. The Eastern Press, Great Britain, U. K. 2 p.
- Moriwaki, J., Sato. T., & Tsukiboshi, T.** 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. Nov. from Japan. *Mycoscience*, 44(1), 0047-0053.
- Mullis, K. B.** (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.
- National Center for Biotechnology Information – NCBI.** 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=34409>[Consulta: 08/01/16]
- Nelson, S,** 2008. Anthracnose of Avocado.
- Ochoa A. S.** 2009. Enfermedades poscosecha del fruto de aguacate. Tercer Congreso Latinoamericano del Aguacate, Medellín – Colombia. Memorias pp, 1-14
- Pallás, V. (Ed.).** 2008. *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*, Mundi-Prensa Libros.
- Pavas Tabares, C.A.** 2015. Organización de cadena productiva del aguacate. Ministerio de Agricultura, Colombia.
- Perfect S.E. Hughes H.A., O’Connell R.J., Green J.R.** 1999. *Colletotrichum*: A model Genus for studies on Pathology and Fungal-Plant Interactions. *Fungal Genet Biol.*; 27:186-198.
- Barcelos, Q.L., A. Pinto J.M., Vaillancourt L. J. y Souza E.A.** 2014. Characterization of *Glomerella* Strains Recovered from Anthracnose lesions on Common Bean Plants in Brazil. *PLOS ONE*, [www.plosone.org](http://www.plosone.org), Vol 9, 15p.

**Ochoa-Ascencio, S.** 2009. Enfermedades poscosecha del fruto de aguacate. Memorias III Congreso Latinoamericano del aguacate, 11-13 de noviembre de 2009. Medellín, Colombia.

Online Auction Color, 2004. Online Auction color chart. Accessed at <http://www.onlineauctioncolorchart.com>.

**Orduz, J. O., & Rangel, J. A.** 2002. Frutales tropicales potenciales para el Piedemonte Llanero.

**Pallás, V.** (Ed.). 2008. Herramientas biotecnológicas en fitopatología, Mundi - Prensa Libros.

**PLAN DE NEGOCIO PARA EL AGUACATE HASS EN COLOMBIA.** Consultado Octubre, 2016. Disponible en: [https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/plan\\_de\\_negocio.pdf](https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/plan_de_negocio.pdf)

**Pitt, J. I., & Hocking, A. D.** 2009. Fungi and food spoilage (Vol, 519). New York: Springer.

**Prusky D.** 2003. Mecanismos de defensa y colonización de los frutos de aguacate por patógenos de poscosecha. V Congreso mundial del aguacate, A-96: 242-243.

**Prusky D., Kobilier L., Plumbley R., Keen N. and Sims J.** 1992. Regulation of natural resistance of avocado fruit for the control of postharvest disease. Second world avocado congress 1992, pp, 479-484.

**Reyes-Amado, C. y Morales-García, L.** 2007. Determinación de la temperatura óptima de desarrollo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporoides* Penz, en aguacate has, en la zona aguacatera de Michoacán, México. Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) 2007, Viña Del Mar, Chile, 12 – 16 Nov, 2007, ISBN No 978-956-17-0413-8.

- Reyes Alemán, J.C.** 1996. Alternative products sprayings against *Colletotrichum gloeosporioides* on 'Rincoatl' avocado fruits. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colin CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, México, 1996. Pp 37-41.  
Tomado de: [http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX\\_1996/Ecologia\\_9\\_6.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX_1996/Ecologia_9_6.pdf)
- Ríos Castaño, D., Corrales Medina D.M., Daza Gómez G. J. y Aristizabal Gallo A.** 2005. Aguacate variedades y patrones importantes para Colombia, 221p.
- Rodríguez López E.S., Cárdenas Soriano E., Hernández D, S., Gutiérrez D.A. y Mayek P.** 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz y Sacc de frutos de aguacatero. Revista Brasileira de fruticultura, 35:989-905.
- Rodríguez-López E. González-Prieto J. Mayek-Pérez N.** 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz,) Penz, Y Sacc. En Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. Revista Mexicana de Fitopatología, 27(1): 53-63.
- Rodríguez López, E. S. et al.** 2008. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz y Sacc en Aguacatero (*Persea americana* Mill): Aspectos bioquímicos y genéticos. México.
- Rodríguez, G. A. F., & Gaitán, A.** 2007. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp., asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD, Centro de investigaciones de Café. CENICAFÉ, 1-13.
- Rodríguez Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H. A.,** (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL, 7(3).
- Rojas, A.** 2011. Conceptos y prácticas de microbiología general, Universidad Nacional Sede Palmira, Colombia.

- Saldarriaga, A.** 2006. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzana y mora, Manizales, 191p. Tesis de Magister en Fitopatología, Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Santacruz Delgado, C. X.** 2016. Caracterización morfológica, patogénica y molecular de especies de *Colletotrichum* spp., causantes de la antracnosis del fruto de ají y pimentón *Capsicum* spp., en el Valle del Cauca.
- Silva-Rojas, H. V., & Ávila-Quezada, G.D.** 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60(5), 899-908.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. & Miller, A. N.** 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(16), 6241-6246.
- Silva-Rojas, H. V., & Ávila-Quezada, G. D.** 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*. 60(5), 899-908.
- PLAN DE NEGOCIO PARA EL AGUACATE HASS EN COLOMBIA.** Consultado Octubre, 2016. Disponible en: [https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/plan\\_de\\_negocio.pdf](https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/plan_de_negocio.pdf)
- Pitt, J. I. & Hocking, A. D.** 2009. *Fungi and food spoilage* (Vol, 519), New York: Springer.
- Rodríguez Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H.A.** (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3).

**Rojas, A.** 2011. Conceptos y prácticas de microbiología general, Universidad Nacional Sede Palmira, Colombia.

**Schoch, C. L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Miller, A. N.** 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.

**Silva-Rojas, H. V., & Ávila-Quezada, G. D.** 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado, *Plant Pathology*, 60(5), 899-908.

**Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., & Oliveira, H.** (2002), Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology*, 92(9), 986-996.

**Taylor, J. W., & Fisher, M. C.** (2003). Fungal multilocus sequence typing—it's not just for bacteria. *Current opinion in microbiology*. 6(4), 351-356.

**Téliz D. y Mora A.** 2007. El aguacate y su manejo integrado. Segunda edición. Mundi Prensa México.

**Than, P. P., Jeewon, R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., Taylor, P. W. J.** 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*.57: 562-572.

**The Online Auction Color Chart TM.** Copyright © 2004. [ en línea ], Colombia:  
[consultado enero,, 2016], Disponible en internet:  
<<http://www.onlineauctioncolorchart.com/>>

**Tkacz, J. S., & Lange, L.** (2004). Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. Springer Science & Business Media.

- Trigos, Á. y Ortega-Regules, A.** (2002). Selective destrtuction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. *Mycologia*. 94 (4), 563-568.
- Tovar Rocha, J.C.** 2012. Morfología, sensibilidad *in vitro* y caracterización molecular de cepas de *Colletotrichum* spp., obtenidas de aguacate “Hass” en Michoacán. Tesis de grado. Tomado de: <http://hdl.handle.net/123456789/5387>
- Tupaz, V., Andrés, A., Betancourt, F. F., Olivares, L., Pulido, W., Daniel Sènz, A. & Ariffin, D. B. W.** 2013. Actualización tecnológica y buenas prácticas (BPA) en el cultivo de aguacate. In No, 021 (2006) (No, LC-0750). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.
- Velázquez-del Valle, M. G., Campos-Martínez, A., Flores-Moctezuma, H. E., Suárez-Rodríguez, R., Ramírez-Trujillo, J. A., & Hernández-Lauzardo, A. N.** 2016. First Report of Avocado Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* in Mexico. *Plant Disease*.
- Velho, A., Alaniz, S., Casanova, L., Mondino, P., & Stadnik, M.** 2015. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. *Fungal Biology*. 119(4), 229-244, <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.009>
- Vidales, F., Coria, A. Anguiano, C., & Alacántar, R.** 2005. Control Integrado de la Antracnosis del Aguacate. Abril 3, 2016. de INIFAP Sitio web: [http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo\\_sectorial/Michoacan/10michoacan.pdf](http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo_sectorial/Michoacan/10michoacan.pdf)
- White T.J. Bruns T. Lee S. Taylor J.W.** (1990). Amplification and direct sequencing offungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds), Academic Press: New York: 315–322.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U.** 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex, *Studies in mycology*, 73, 115-180.

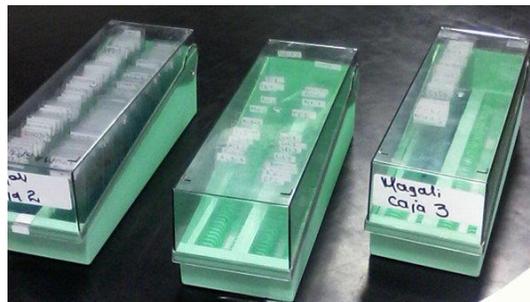
- Whiley A.W., Schaffer B. and Wolstenholme B.N.** 2007. El Palto: Botànica, producción y usos. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Press. Valparaíso, Chile, 364 pp.
- Willingham S.L. Cooke A.W. Coates L.M. Pegg K.G.** 2000. Pepper spot: a new preharvest *Colletotrichum* disease of avocado cv. Hass. Australasian Plant Pathology 29, 151.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. & Taylor, J. W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 18(1), 315-322.
- Yabrudy, J.** (2012). El aguacate en Colombia estudio de caso de los Montes de María en El Caribe colombiano. Revista Documentos de trabajo sobre Economía regional, CO, 8(171), 45.

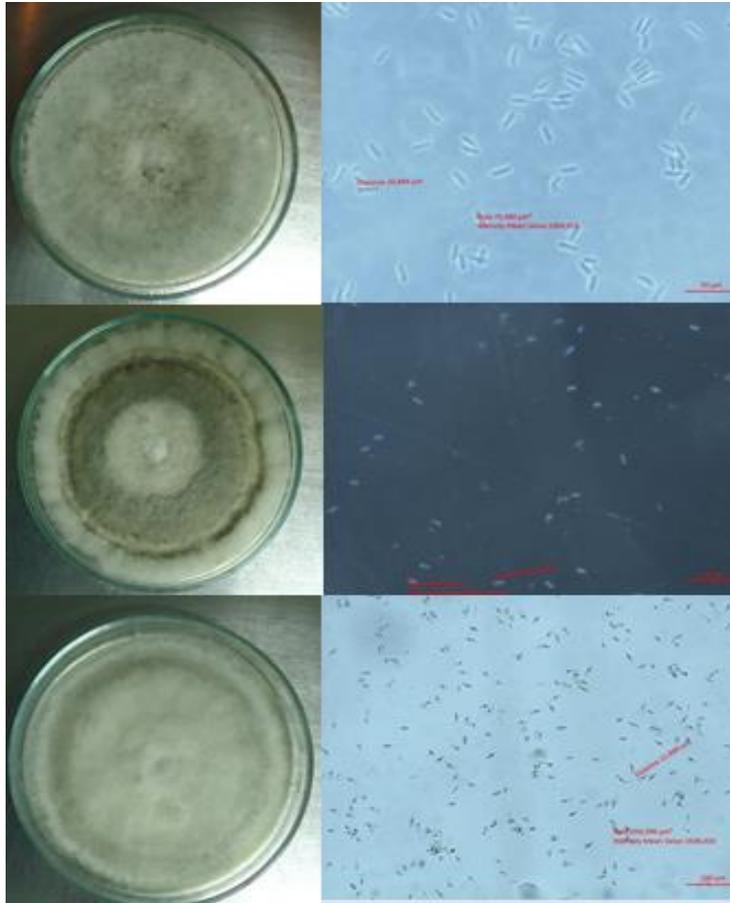


## 6. Anexos

### Anexo 1: Medicion crecimiento radial.

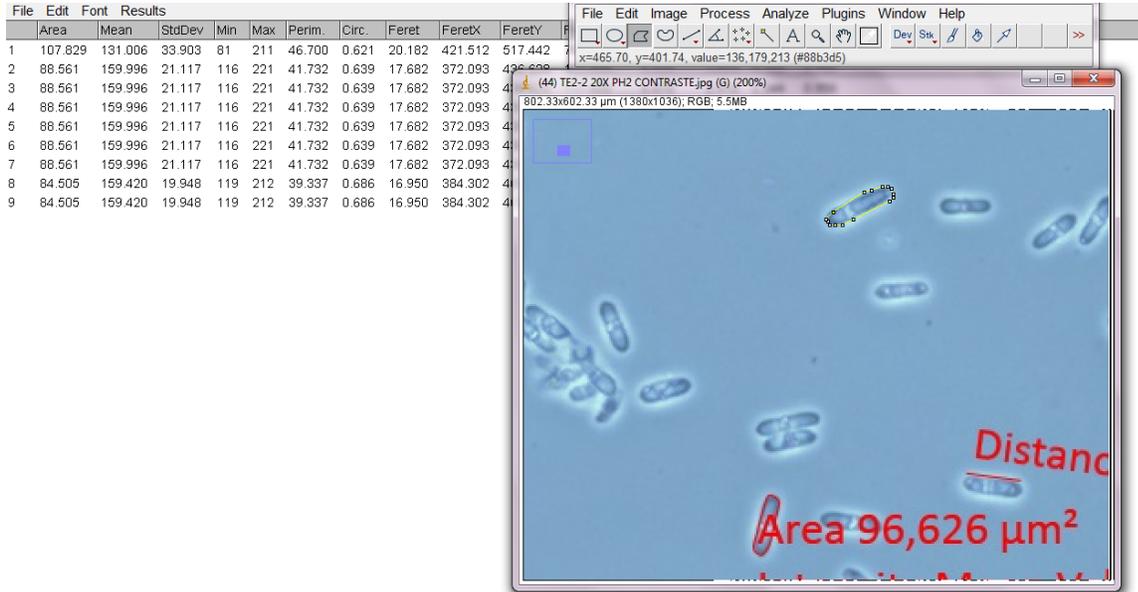


**Anexo 2: Montaje de placas.****Anexo 3: Placas listas para fotografías.**

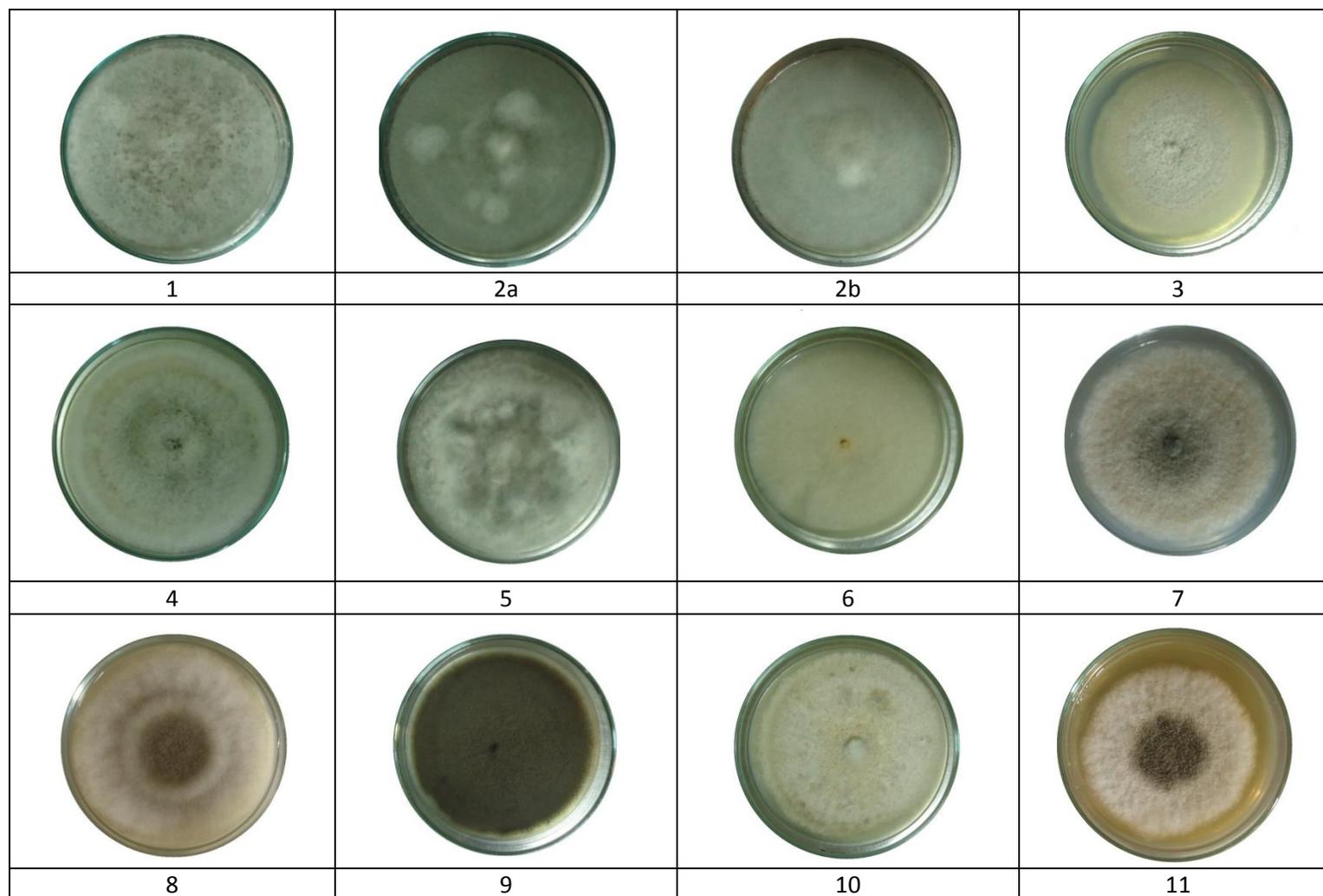
**Anexo 4: Fotografías en el microscopio óptico.**

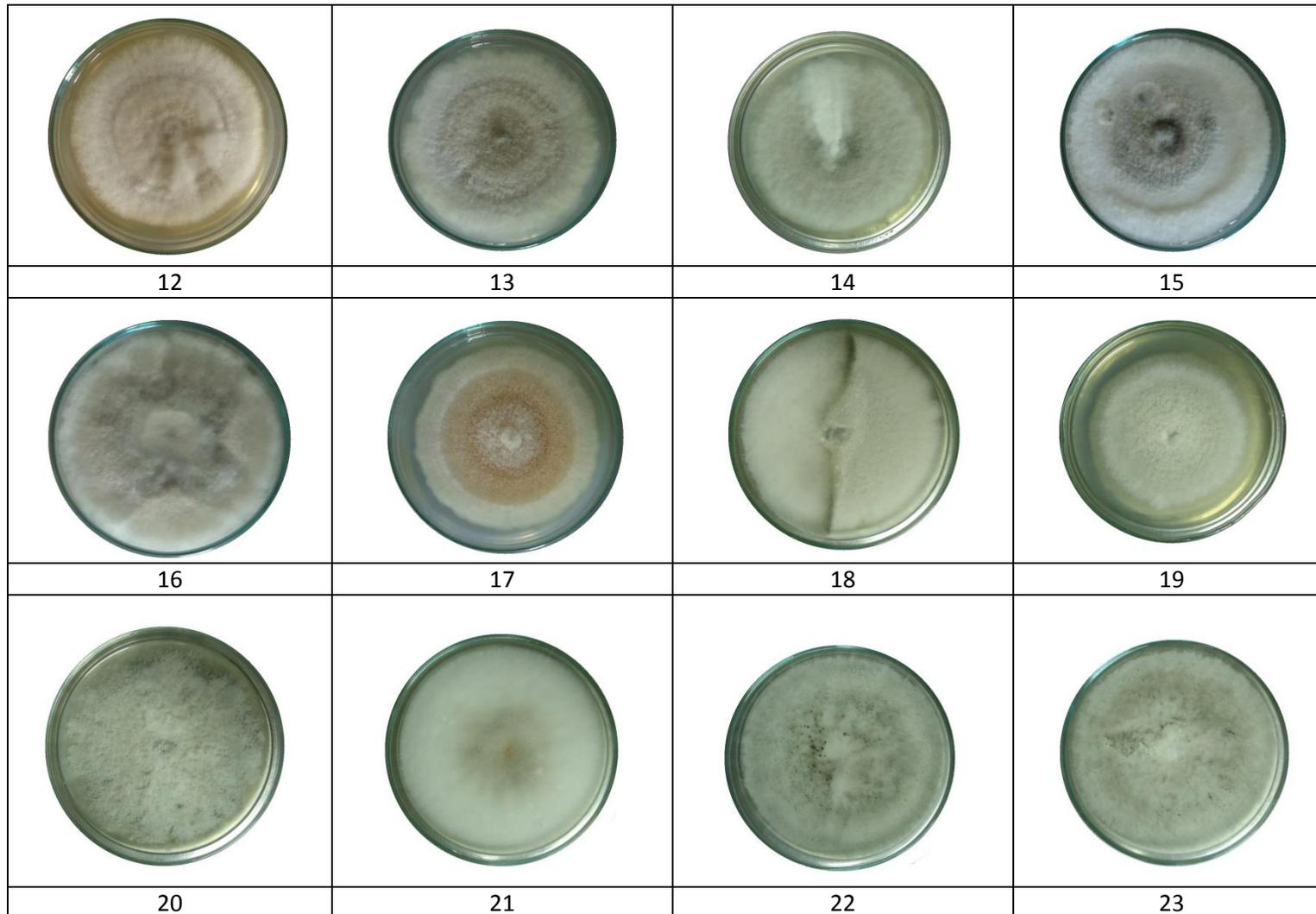
**A.** fotografía en microscopio óptico, a 40x contraste. **B.** fotografía en microscopio óptico 20x campo oscuro. **C.** fotografía microscopio óptico 20x campo claro.

**Anexo 5: Análisis fotográfico con Image J.**

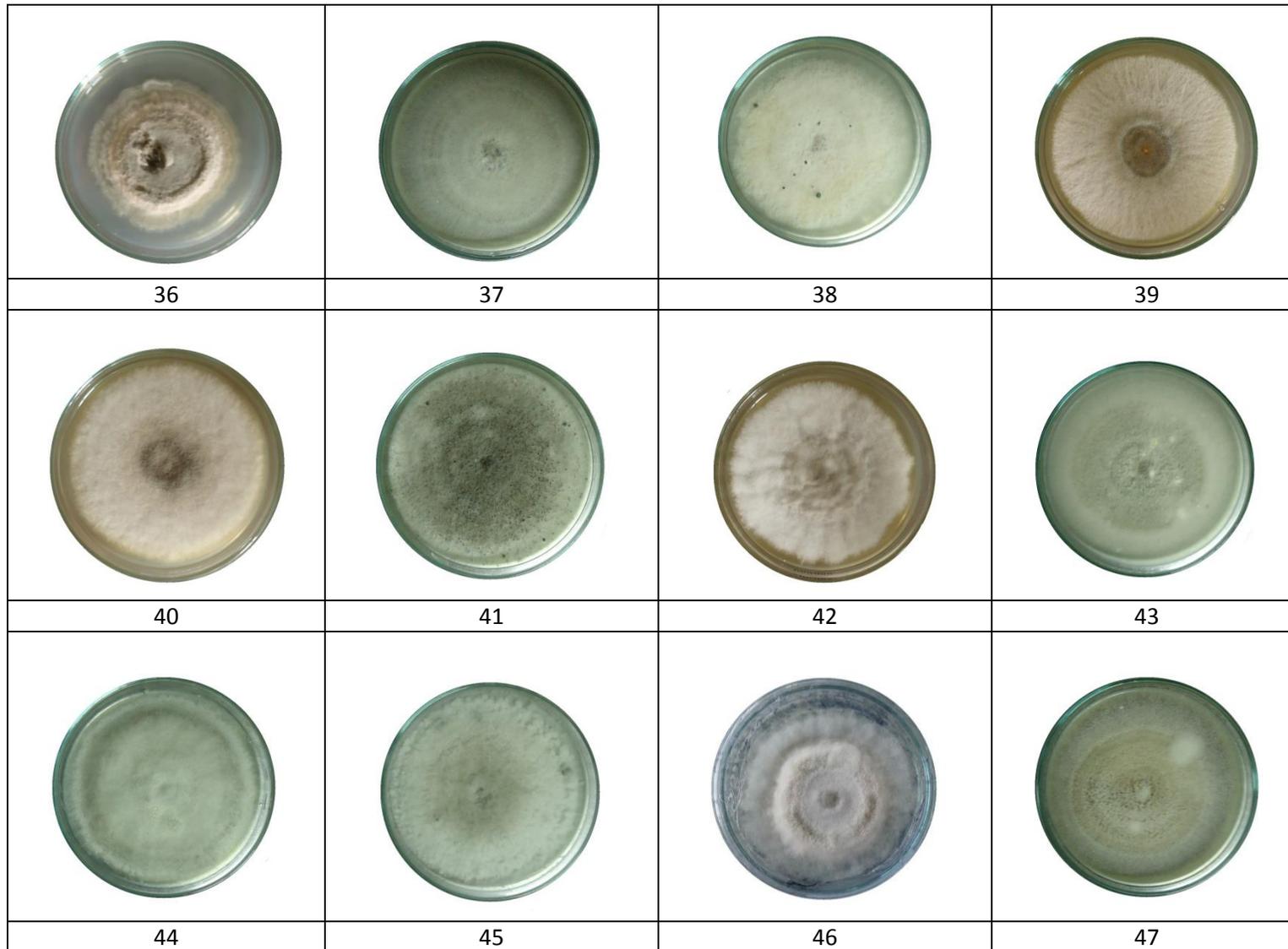


**Anexo 4. Aislamientos de *Colletotrichum* spp. Anverso.**

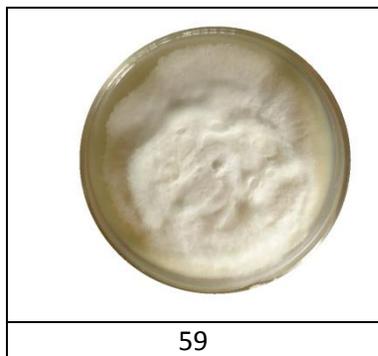




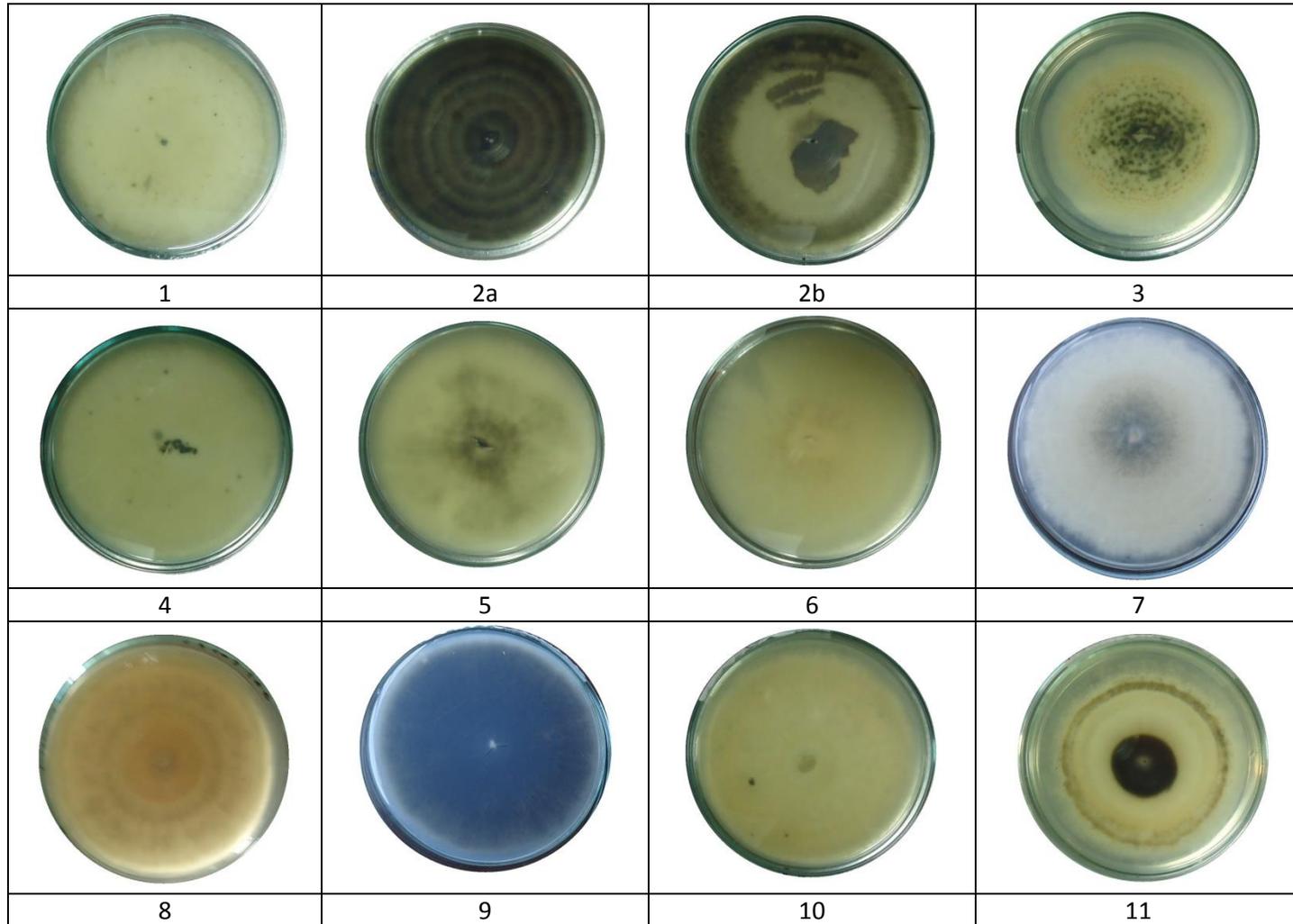
			
24	25	26	27
			
28	29	30	31
			
32	33	34	35

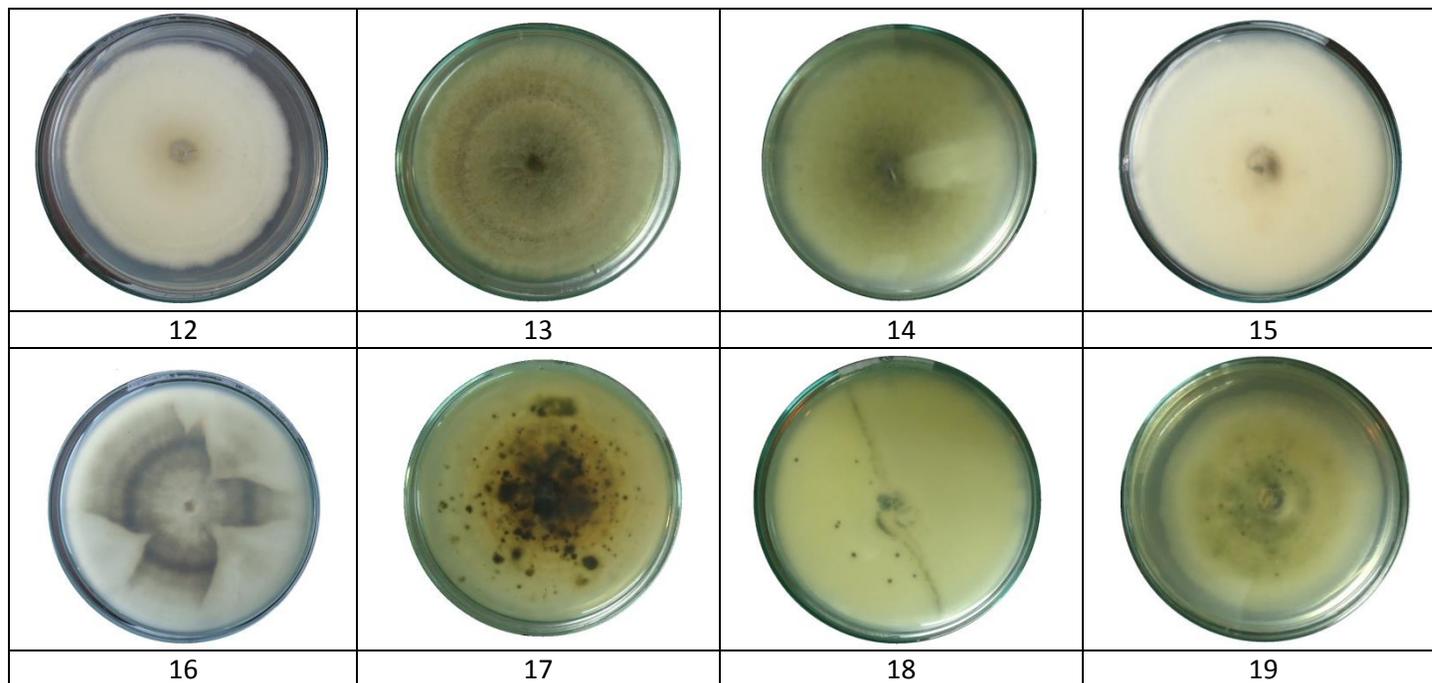


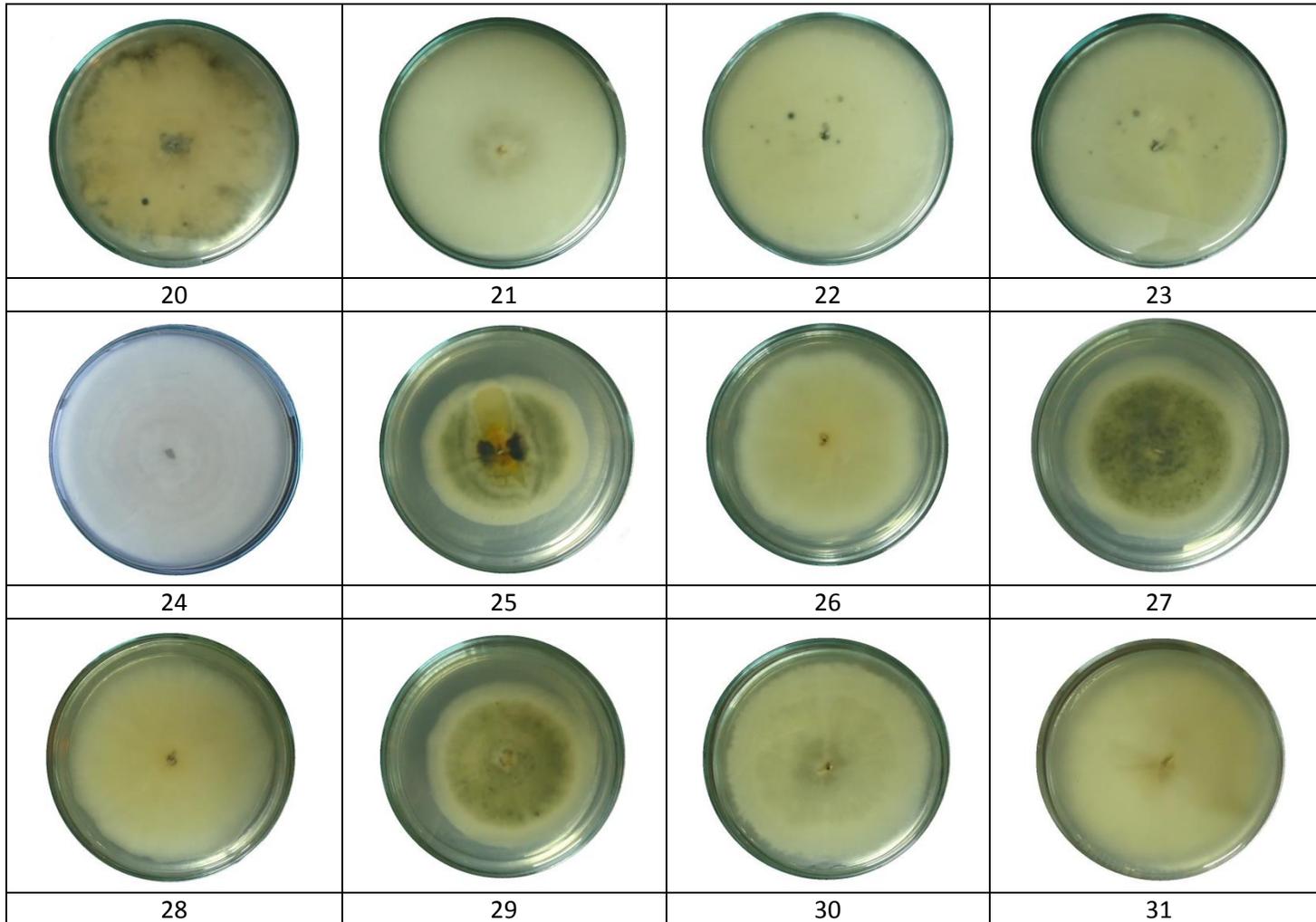
			
48	49	50a	50b
			
51	52	53	54
			
55	56	57	58

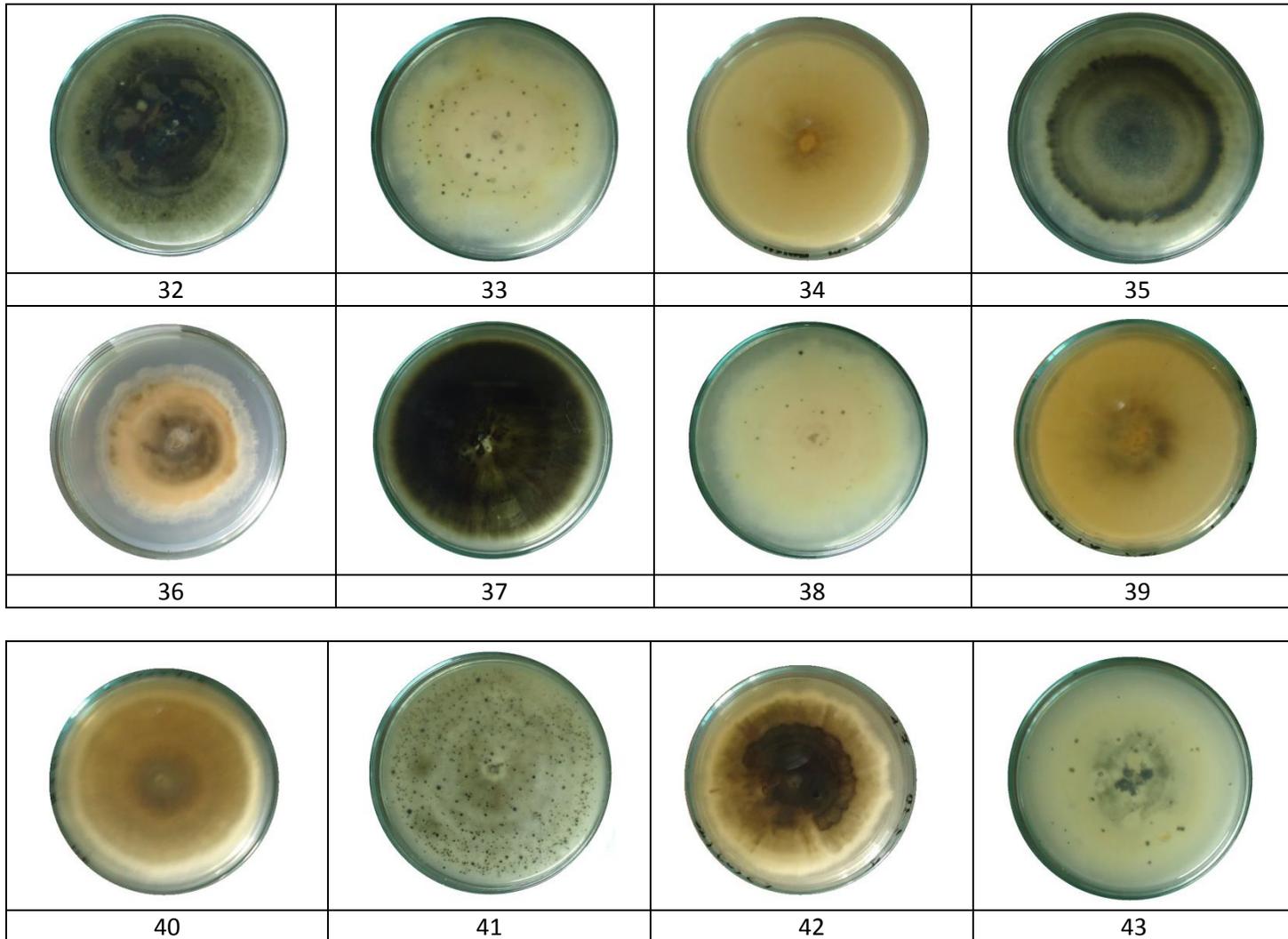


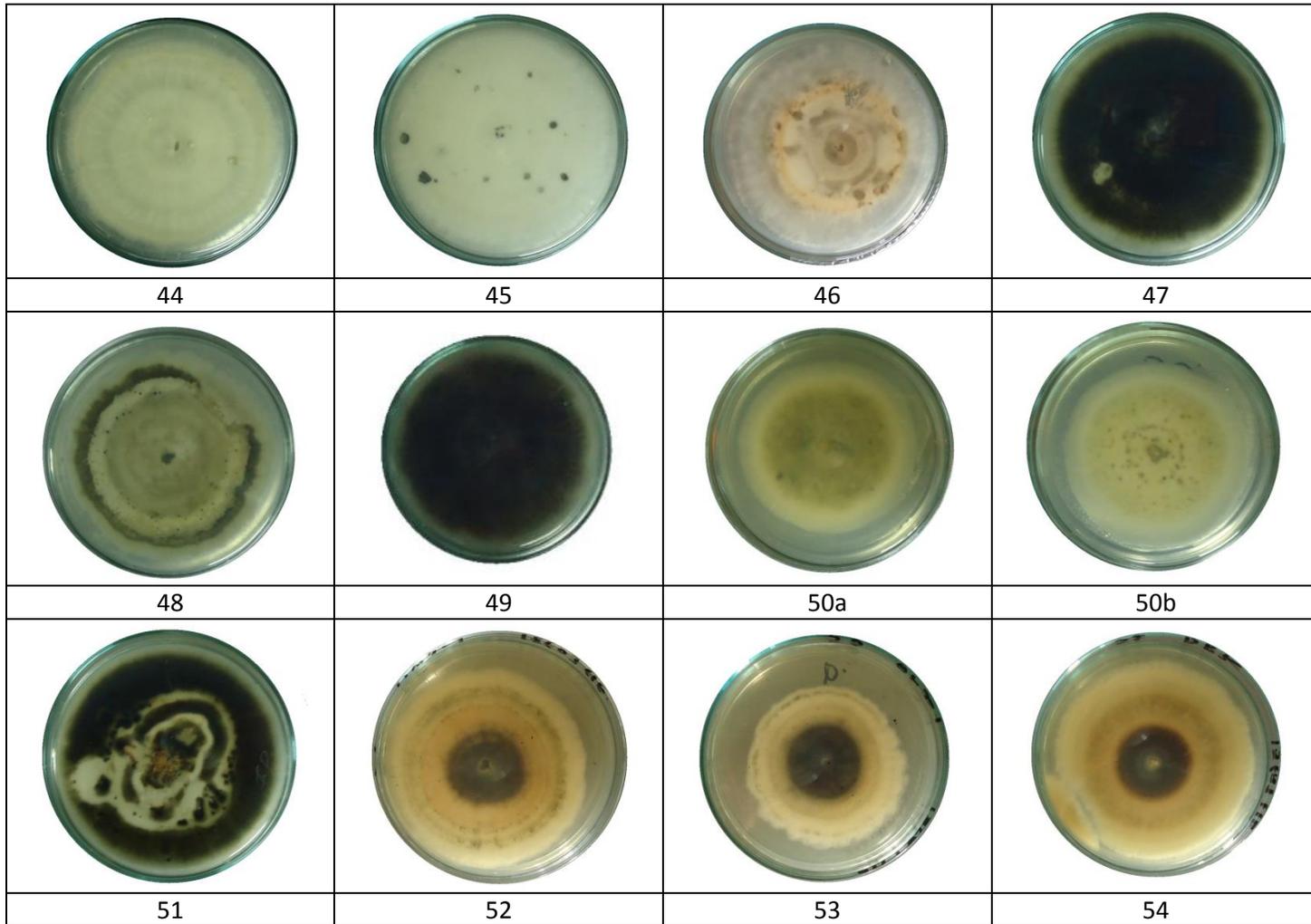
**Figura 66: Aislamientos de *Colletotrichum* spp. Reverso.**

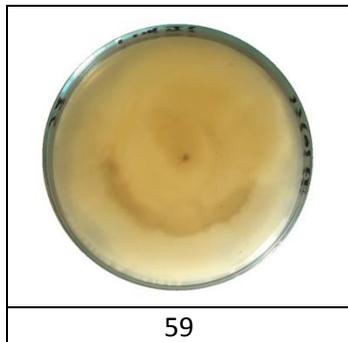
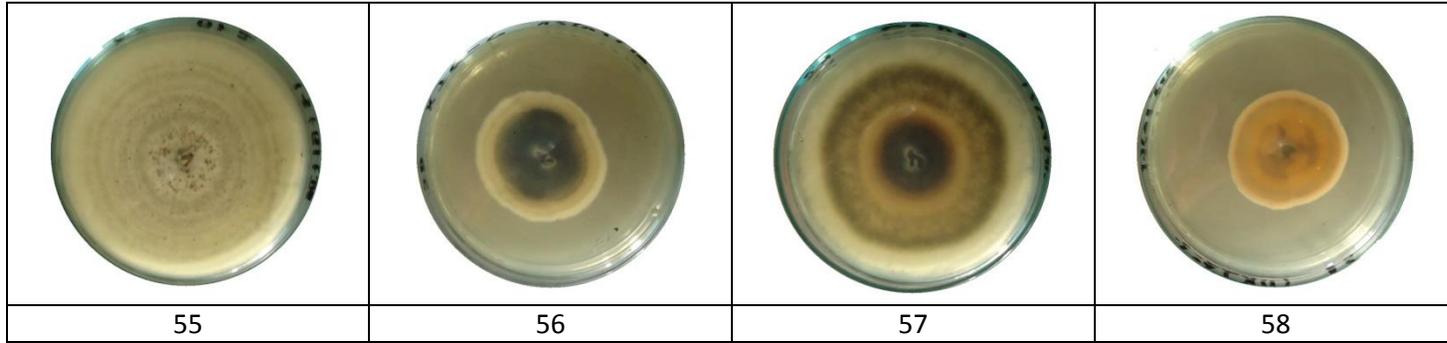


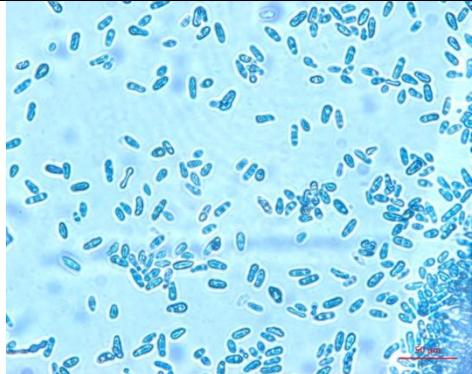
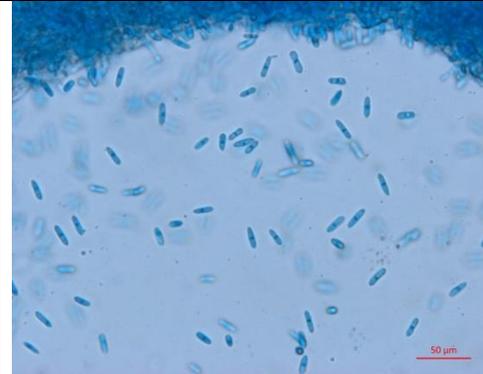
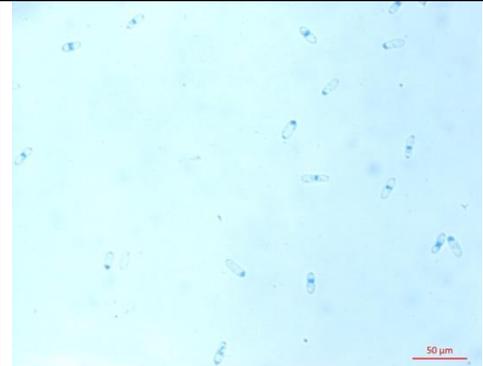


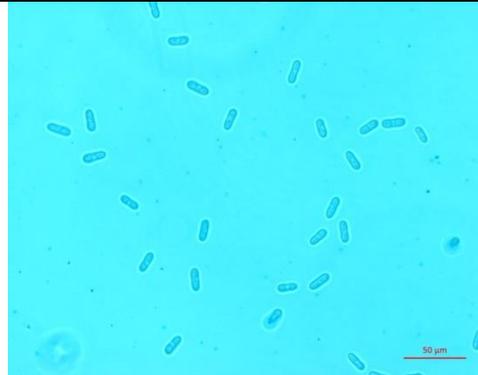
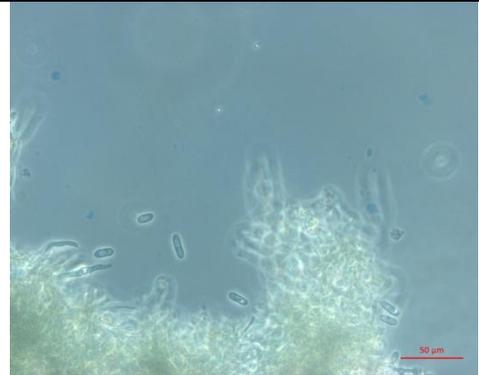


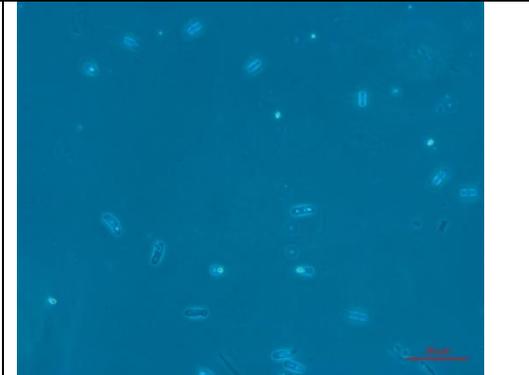
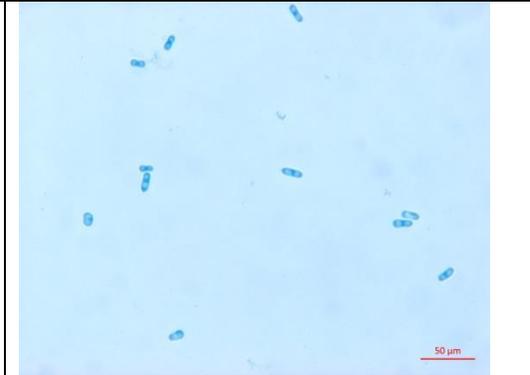
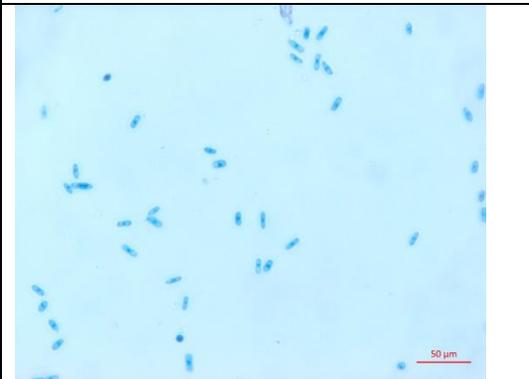
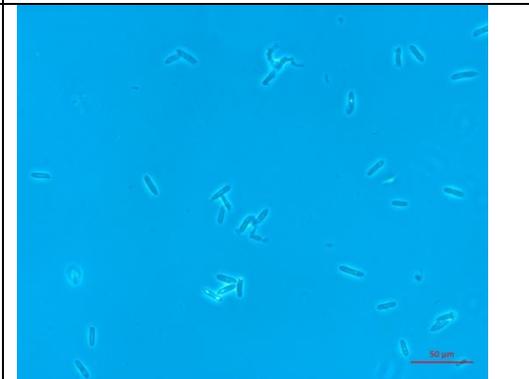
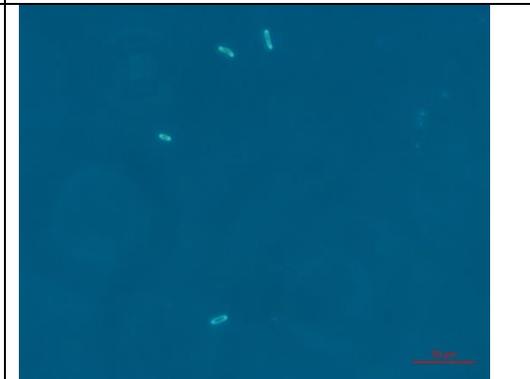


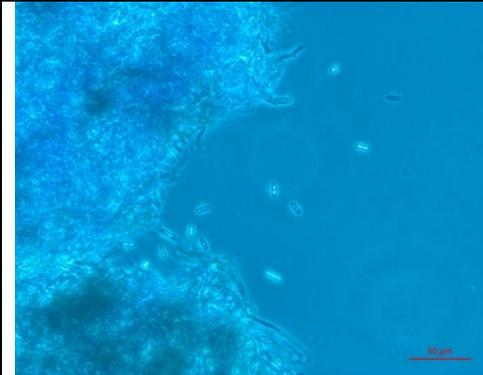
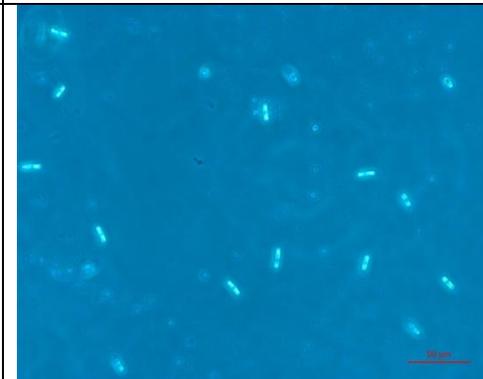
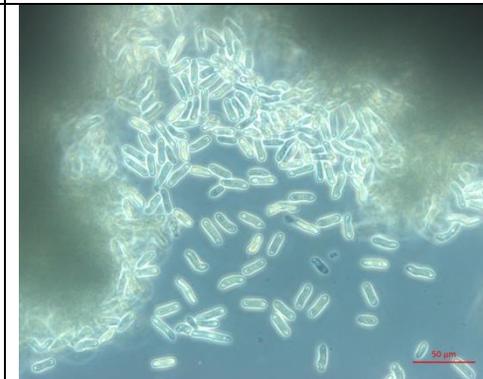




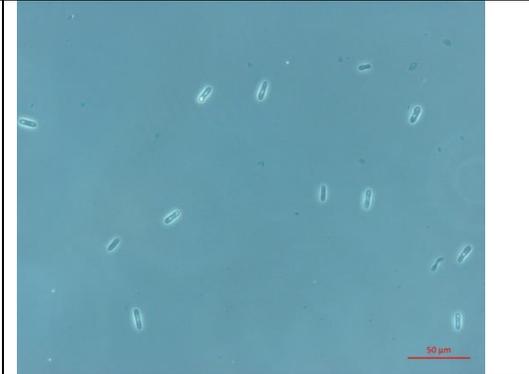
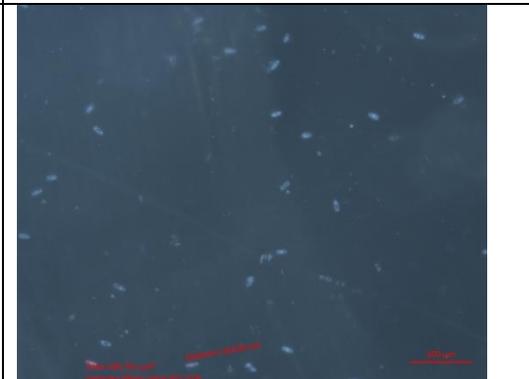
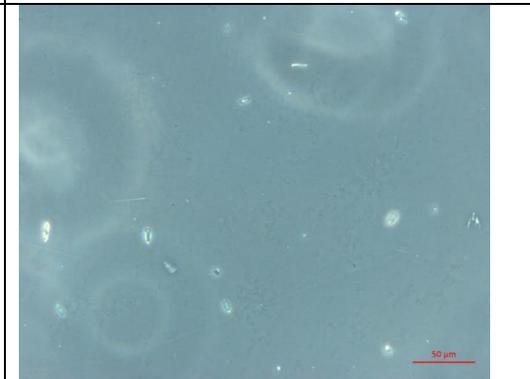
		
<p><b>Aislamiento 1.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Arriñonada, 18 <math>\mu\text{m}</math> largo X 5 <math>\mu\text{m}</math> ancho y 82 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 2.</b>, Campo claro (BF) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 10 <math>\mu\text{m}</math> largo X 4 <math>\mu\text{m}</math> ancho y 36 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 3.</b>, Campo claro (BF) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 14 <math>\mu\text{m}</math> largo X 4 <math>\mu\text{m}</math> ancho y 56 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>
		
<p><b>Aislamiento 4.</b>, Campo claro (BF) 40X. <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Arriñonada, 17 <math>\mu\text{m}</math> largo X 5 <math>\mu\text{m}</math> ancho y 75 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 5.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 22 <math>\mu\text{m}</math> largo X 7 <math>\mu\text{m}</math> ancho y 147 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 6.</b>, Campo claro (BF) 40X. <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 16 <math>\mu\text{m}</math> largo X 5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 76 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>

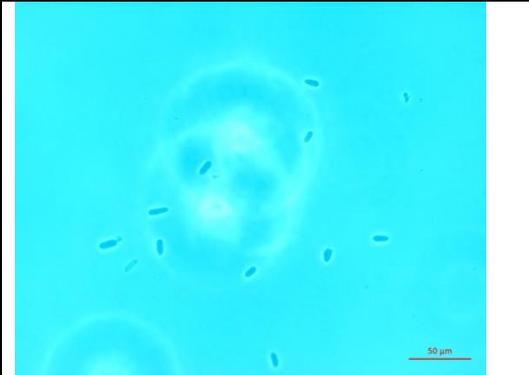
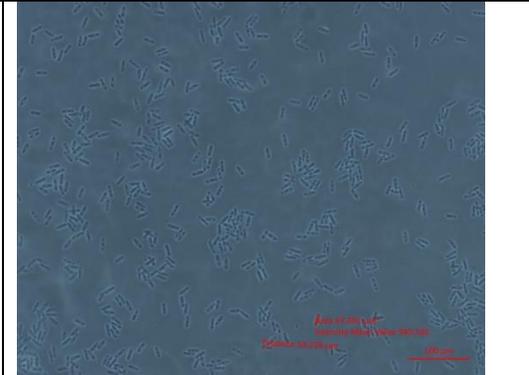
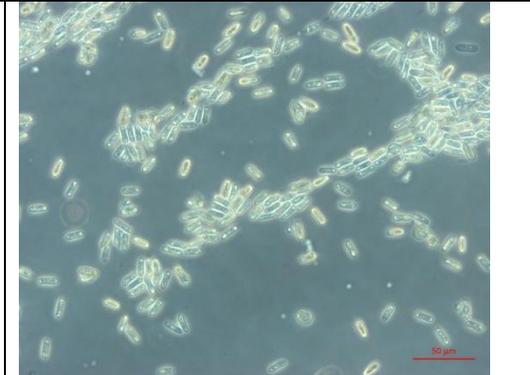
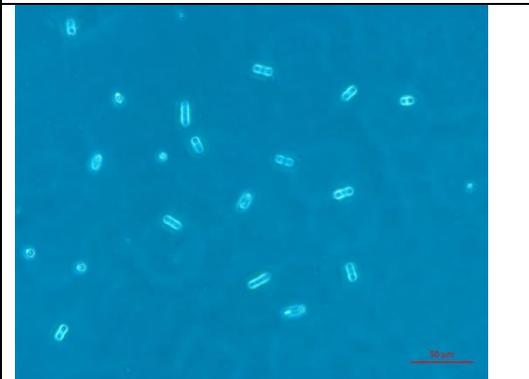
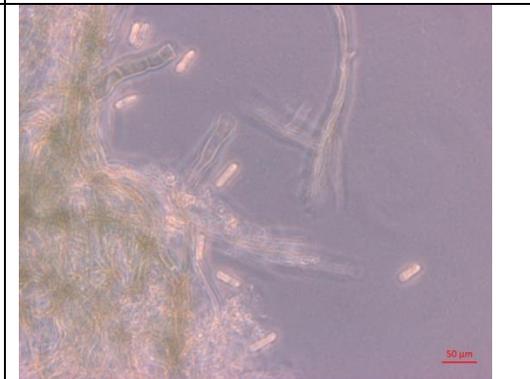
		
<p><b>Aislamiento 7.</b>, Campo claro (BF) 40X. <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>). <b>Conidia:</b> Oblonga, 18 <math>\mu\text{m}</math> de largo X 6 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 96 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 8.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>). <b>Conidia:</b> Oblonga, 16 <math>\mu\text{m}</math> de largo X 5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 78 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 9.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>). <b>Conidia:</b> Arriñonada, 20 <math>\mu\text{m}</math> de largo X 6 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 100 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>
		
<p><b>Aislamiento 10.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>). <b>Conidia:</b> Oblonga, 15 <math>\mu\text{m}</math> de largo X 5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 69 <math>\mu\text{m}^2</math> de área</p>	<p><b>Aislamiento 11.</b>, Campo claro (BF) 40X. <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>). <b>Conidia:</b> Oblonga 17 <math>\mu\text{m}</math> de largo X 6 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 87 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 12.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>). <b>Conidia:</b> Oblonga, 16 <math>\mu\text{m}</math> de largo X 6 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 86 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>

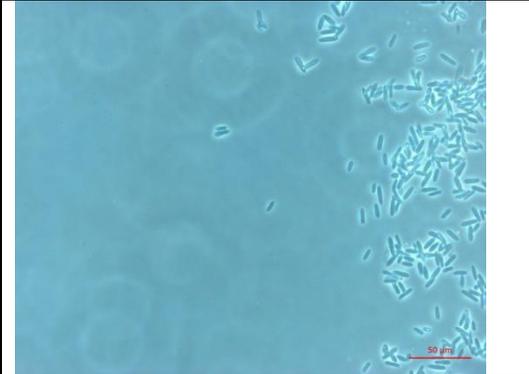
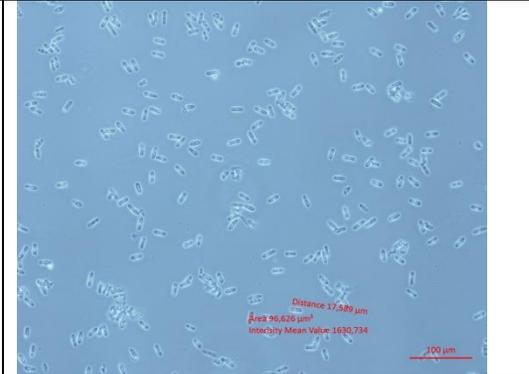
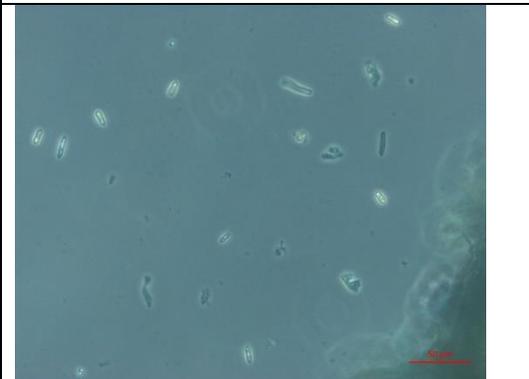
		
<p><b>Aislamiento 13.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 17 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 6 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 89 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 14.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Arriñonada, 16 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 79 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 15.</b>, Campo claro (BF) 40X.  <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 12 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 6 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 58 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>
		
<p><b>Aislamiento 16.</b>, Campo claro (BF) 40X.  <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 12 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 6 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 59 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 17.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 16 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 4 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 62 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 18.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 14 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 62 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>

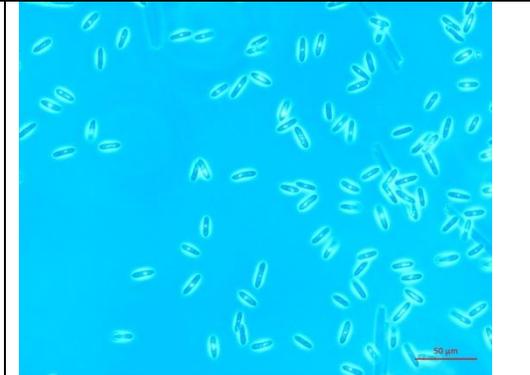
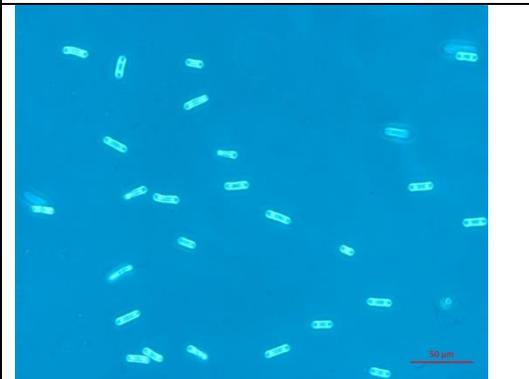
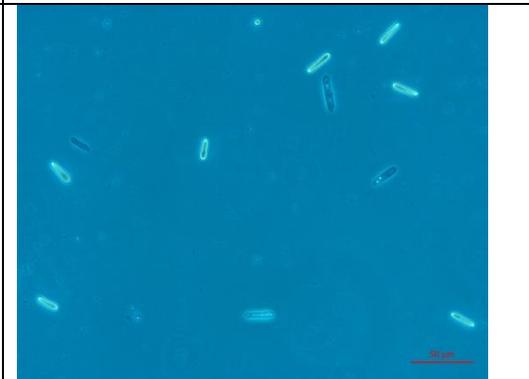
		
<p><b>Aislamiento 19.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 µm).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 11 µm de largo x 4 µm de ancho y 36 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 20.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Arriñonada, 21 µm de largo x 5 µm de ancho y 103 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 21.</b>, Contraste de fases (Ph2) 20X., <b>Escala:</b>(100 µm).  <b>Conidia:</b> Oblonga 18 µm de largo x 7 µm de ancho y 107 µm<sup>2</sup> de área.</p>
		
<p><b>Aislamiento 22.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Arriñonada 21 µm de largo x 5 µm de ancho y 97 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 23.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 µm).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 16 µm de largo X 5 µm de ancho y 76 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 24.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Arriñonada, 19 µm de largo X 5 µm de ancho y 88 µm<sup>2</sup> de área.</p>

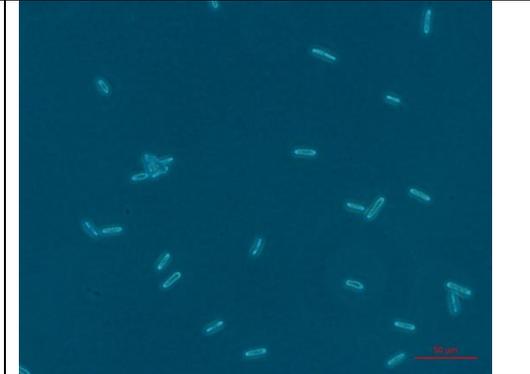
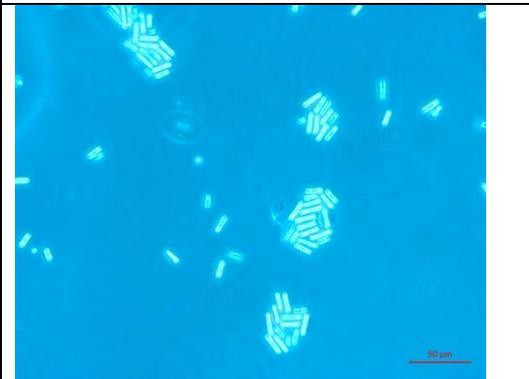
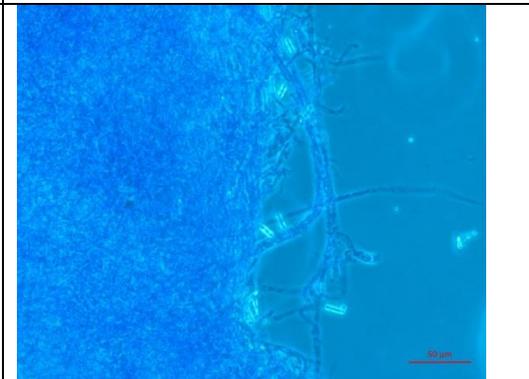
<p><b>Aislamiento 25.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 µm).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 15 µm de largo x 4 µm de ancho y 59 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 26.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 µm).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 13 µm de largo x 4 µm de ancho y 49 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 27.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Arriñonada, 17 µm de largo x 4 µm de ancho y 63 µm<sup>2</sup> de área.</p>
<p><b>Aislamiento 28.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b>(50 µm).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 12 µm de largo x 4 µm de ancho y 45 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 29.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 14 µm de largo x 6 µm de ancho y 69 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 30.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 13 µm de largo x 4 µm de ancho y 55 µm<sup>2</sup> de área.</p>

		
<p><b>Aislamiento 31.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> fusiforme, 12 µm de largo x 4 µm de ancho y 42 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 32.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Arriñonada, 14 µm de largo x 4 µm de ancho y 47 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 33.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 15 µm de largo x 5 µm de ancho y 70 µm<sup>2</sup> de área.</p>
		
<p><b>Aislamiento 34.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 17 µm de largo x 5 µm de ancho y 75 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 35.</b>, Campo oscuro (DF) 20X., <b>Escala:</b> (100 µm).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 16 µm de largo x 5 µm de ancho y 76 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 36.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 12 µm de largo x 4 µm de ancho y 47 µm<sup>2</sup> de área.</p>

		
<p><b>Aislamiento 37.</b>, Campo claro (BF) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> Elíptica, 13 µm de largo x 5 µm de ancho y 56 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 38.</b>, Contraste de fases (Ph2) 20X., <b>Escala:</b> (100 µm). <b>Conidia:</b> Fusiforme, 18 µm de largo x 5 µm de ancho y 86 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 39.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> Oblonga, 15 µm de largo x 5 µm de ancho y 63 µm<sup>2</sup> de área.</p>
		
<p><b>Aislamiento 40.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> Oblonga, 15 µm de largo x 7 µm de ancho y 92 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 41.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> fusiforme, 17 µm de largo x 5 µm de ancho y 78 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 42.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> Oblonga, 16 µm de largo x 5 µm de ancho y 77 µm<sup>2</sup> de área.</p>

		
<p><b>Aislamiento 43.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> Fusiforme, 12 µm de largo x 3 µm de ancho y 37 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 44.</b>, Contraste de fases (Ph2) 20X., <b>Escala:</b> (100 µm). <b>Conidia:</b> Oblonga, 19 µm de largo x 5 µm de ancho y 90 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 45.</b>, Campo claro (BF) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> Arriñonada, 20 µm de largo x 6 µm de ancho y 110 µm<sup>2</sup> de área.</p>
		
<p><b>Aislamiento 46.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> Fusiforme, 14 µm de largo x 4 µm de ancho y 53 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 47.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> Fusiforme, 15 µm de largo x 4 µm de ancho y 62 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 48.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm). <b>Conidia:</b> Fusiforme, 16 µm de largo x 5 µm de ancho y 75 µm<sup>2</sup> de área.</p>

		
<p><b>Aislamiento 49.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 15 µm de largo x 5 µm de ancho y 64 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 50.</b>, Contraste de fases (BF) 20X., <b>Escala:</b> (100 µm).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 15 µm de largo x 4 µm de ancho y 59 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 51.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 17 µm de largo x 4 µm de ancho y 67 µm<sup>2</sup> de área.</p>
		
<p><b>Aislamiento 52.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Arriñonada, 18 µm de largo x 5 µm de ancho y 87 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 53.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 21 µm de largo x 5 µm de ancho y 92 µm<sup>2</sup> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 54.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 µm).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 17 µm de largo x 5 µm de ancho y 85 µm<sup>2</sup> de área.</p>

		
<p><b>Aislamiento 55.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 21 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 95 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 56.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 17 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 4 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 69 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 57.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Fusiforme, 17 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 81 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>
		
<p><b>Aislamiento 58.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 16 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 4 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 68 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	<p><b>Aislamiento 59.</b>, Contraste de fases (Ph2) 40X., <b>Escala:</b> (50 <math>\mu\text{m}</math>).  <b>Conidia:</b> Oblonga, 15 <math>\mu\text{m}</math> de largo x 4 <math>\mu\text{m}</math> de ancho y 62 <math>\mu\text{m}^2</math> de área.</p>	

