



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Caracterización morfológica y molecular de  
*Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame  
(*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala  
de virulencia para su caracterización patogénica**

**Yeimy Alexandra Pinzón Gutiérrez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Postgrado Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2014



# **Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica**

**Yeimy Alexandra Pinzón Gutiérrez**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magister en Microbiología**

Director (a):

Ph.D. Gustavo Buitrago Hurtado

Línea de Investigación:

Biotecnología Agrícola

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación sobre el cultivo del Ñame

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Postgrado Microbiología

Bogotá, Colombia

2014



*A mi madre, mi maestra de vida y mejor referencia de amor, entrega, dedicación, responsabilidad, fortaleza y paciencia.*



# Agradecimientos

A Dios por trazar para mí un plan de vida colmado de bendiciones.

A mi Director Gustavo Buitrago por su acertado consejo y aporte a mi formación.

A mi Codirectora Silvia Bustamante por su empeño constante en apoyar mi formación académica, por depositar su confianza en mi trabajo y por contribuir a mi crecimiento personal. Gracias por ser un ejemplo de emprendimiento, perseverancia, positivismo, solidaridad y éxito.

A todos los miembros del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia a quienes considero mi familia, su compañía y apreciación alegraron el diario quehacer. De manera especial agradezco al grupo de investigación sobre el cultivo de ñame, al grupo de investigación línea caucho natural, a los miembros del laboratorio de tejidos vegetales, a Jacqueline Ramírez y Mónica Becerra por su compañía, colaboración y amistad.

A la Maestría en Ciencia Microbiología, en cabeza de la profesora Martha Fontanilla por atesorar conocimiento en las nuevas generaciones. Un agradecimiento especial a Socorrito por acompañar de la mano nuestro proceso de formación.

A mi familia y mi novio por apoyar constantemente mis decisiones, acompañar mis triunfos y alentar mi espíritu en momentos de fracaso. Un reconocimiento especial a Yamith que a pesar de desempeñarse en otro campo profesional se esforzó en comprender y colaborar en el desarrollo de este trabajo.

A Elizabeth por ser mi diaria compañía.





## Resumen

El ñame (*Dioscorea* sp.) es un cultivo representativo y promisorio para los países productores, en sectores como la alimentación, los cosméticos y la industria farmacéutica. Una de las principales limitantes de su producción es la antracnosis, enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. En Colombia esta patología registra su mayor impacto en la Costa Caribe colombiana, por ser esta la región donde se concentra la producción del país. El principal método empleado para el control de la enfermedad es el manejo con agroquímicos que implica riesgos para la salud humana y el medio ambiental, aumento en los costos de producción e inducción de resistencia por parte del patógeno.

El diseño de nuevas alternativas de control requiere que se genere conocimiento del patosistema. Con este propósito, se conformó una colección de 40 aislamientos de *C. gloeosporioides*, de muestras de *Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata* con síntomas asociadas a la enfermedad, procedentes de cinco cultivos ubicados en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar. La colección previa identificación por comparación de secuencias ITS contra bases de datos, fue caracterizada morfológica y molecularmente. Las variables morfológicas evaluadas fueron analizadas con el método de Gower, las huellas genéticas generadas con las metodologías ap-PCR y DAF fueron analizadas con el método de DICE y las secuencias ITS tratadas por parsimonia. La diversidad de la colección fue calculada mediante la fórmula de diversidad genética promedio ( $H_e$ ) a partir de los datos de huellas genómicas. Las relaciones existentes entre niveles de caracterización y su dependencia con los datos de procedencia de los aislados, se establecieron por Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM). Finalmente, pruebas de virulencia fueron realizadas bajo condiciones de invernadero con plántulas de la especie *D. rotundata* y el aislamiento DC 37B, escogido al azar de la colección caracterizada, transcurridos dos meses fueron calculados los datos de área foliar afectada por el patógeno con el programa ImageJ y empleados estos para establecer una escala de virulencia.

Los resultados y análisis de los datos de caracterización evidenciaron alta variabilidad dentro de la colección. El ACM permitió relacionar los grupos obtenidos en cada nivel de caracterización y mostró una dependencia entre los mismos. Como complemento, se encontró que la agrupación de los aislamientos no fue afectada por la ubicación geográfica del cultivo y la especie de ñame de la que se aisló el patógeno. Por último, se establecieron pruebas de patogenicidad y se propuso una escala de virulencia, para la evaluación *ex vitro* de la severidad de la infección causada por el hongo. Este trabajo contribuye al conocimiento de la biología y variabilidad de *C. gloeosporioides* y es un aporte a futuros estudios de la epidemiología de la antracnosis en cultivos de ñame del

Caribe colombiano. Los resultados además sugirieron la presencia de un complejo *C. gloeosporioides sensu lato*, posiblemente acompañado de otras especies del género *Colletotrichum*, en el desarrollo de la enfermedad.

**Palabras clave:** *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dioscorea* sp., caracterización morfológica, caracterización molecular, Análisis de Correspondencia Múltiple, escala de virulencia.

## Abstract

The yam crop (*Dioscorea* sp.) is a representative and promising crop for producing countries, in sectors such as food, cosmetics and pharmaceutical industries. One of the main limitations of their production is anthracnose, a disease caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. In Colombia this pathology has its greatest impact on the Colombian Caribbean Coast, as this is the region where production is concentrated. The main method used to control this disease is agrochemical management involving risks to human health and the environment, increased production costs, and induction of resistance by the pathogen.

The design of new control alternatives requires knowledge of the pathosystem. To this aim, a collection was formed with 40 isolates of *C. gloeosporioides* from *Dioscorea alata* and *Dioscorea rotundata* with symptoms associated with the disease, originating from five crops in the departments of Córdoba, Sucre, and Bolívar. The collection before identification by ITS sequence comparison against databases was characterized morphologically and molecularly. The morphological variables evaluated were analyzed with the Gower method, the genetic fingerprints generated with ap-PCR and DAF methodologies were analyzed with DICE method, and ITS sequences were treated by parsimony. The diversity of the collection was calculated using the average genetic diversity ( $H_e$ ) formula with genomic fingerprints data. The relationships between levels of characterization and its dependence on the origin data from isolates were established by Multiple Correspondence Analysis (MCA). Finally, virulence tests were performed under greenhouse conditions with seedlings of the species *D. rotundata* and the isolates DC 37B, chosen at random from the collection characterized, after a lapse of two months the leaf area affected by the pathogen was calculated with the program ImageJ and these were used to establish a level of virulence.

The results and analysis of the characterization data showed high variability within the collection. A MCA linking the groups was obtained at each level of characterization and a dependency was shown between them. As a complement, we found that the clustering of isolates was not affected by the geographical location of crop and yam species from which the pathogen was isolated. Finally, pathogenicity tests were established and a severity score was proposed to *ex vitro* evaluation of the severity of the infection caused by the fungus. This work contributes to the knowledge of the biology and variability of *C.*

*gloeosporioides* and is a contribution to future studies of the epidemiology of anthracnose in yam crops in the Colombian Caribbean Coast. The results also suggested the presence of a *C. gloeosporioides sensu lato* species complex, possibly accompanied by other species of *Colletotrichum* in the development of the disease.

**Keywords:** *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dioscorea* sp., morfological characterization, molecular characterization, Multiple Correspondence Analysis, severity scores.

# Contenido

<b>1. El cultivo de ñame .....</b>	<b>5</b>
1.1 Descripción de la planta.....	8
1.2 Ciclo del cultivo.....	10
1.3 Usos .....	11
1.4 Limitantes del cultivo de ñame.....	12
<b>2. Antracnosis .....</b>	<b>13</b>
2.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> : agente etiológico de la antracnosis en ñame ..	13
2.2 Determinantes de patogenicidad.....	15
2.3 Ciclo de la enfermedad.....	18
2.4 Signos y síntomas en ñame.....	20
2.5 Identificación y caracterización de <i>C. gloeosporioides</i> .....	21
2.6 Control.....	23
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>25</b>
3.1 Muestras.....	25
3.2 Aislamiento de <i>C. gloeosporioides</i> .....	25
3.3 Extracción de ADN.....	25
3.4 Amplificación y secuenciación de Espaciadores Internos Transcriptos (ITS) ....	26
3.5 Descripción de rasgos morfológicos.....	26
3.6 Evaluación de Marcadores Moleculares.....	27
3.7 Asociación entre características morfológicas y moleculares.....	28
3.8 Establecimiento de una escala de virulencia.....	28
3.8.1 Propagación y aclimatación de <i>D. rotundata</i> .....	28
3.8.2 Preparación del inóculo infectivo .....	29
3.8.3 Prueba de patogenicidad.....	29
3.8.4 Ensayos de virulencia.....	29
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>31</b>
4.1 Identificación del agente causal y síntomas de la antracnosis en ñame.....	31
4.2 Caracterización morfológica y molecular.....	34
4.3 Asociación entre características morfológicas y moleculares.....	40
4.4 Establecimiento de una escala de virulencia.....	45
<b>5. Conclusiones y Recomendaciones .....</b>	<b>50</b>
▪ Productos generados .....	51

## Lista de figuras

<b>Figura 1-1:</b>	Promedio de la proporción de producción por continente, 1992-2012.....	6
<b>Figura 1-2:</b>	Lista de los 20 países con mayor producción a nivel mundial al 2012 .....	7
<b>Figura 1-3:</b>	Área sembrada, Producción y rendimiento del cultivo de ñame en Colombia durante el periodo de 1992 a 2011.....	8
<b>Figura 2-1:</b>	Ciclo de la antracnosis causada por <i>C. gloeosporioides</i> (Agrios, 2005) .....	18
<b>Figura 2-2:</b>	Estrategias de colonización del género <i>Colletotrichum</i> . <b>A.</b> Hemibiotrofia Intracelular: <b>B.</b> Necrotrofia intramural subcuticular.....	19
<b>Figura 4-1:</b>	Aislamientos fúngicos obtenidos a partir de tejido vegetal con síntomas de antracnosis .....	31
<b>Figura 4-2:</b>	<b>A.</b> Amplificación de aislados del género <i>Colletotrichum</i> asociados al cultivo de ñame con iniciadores ITS universales. <b>B.</b> Repetición muestras no amplificadas .....	32
<b>Figura 4-3:</b>	Síntomas asociados a antracnosis en ñame en cultivos de la Costa Caribe colombiana.....	33
<b>Figura 4-4:</b>	Dendograma construido por el método UPGMA a partir del coeficiente de similaridad de Gower de las variables morfológicas evaluadas en la colección .....	35
<b>Figura 4-5:</b>	Árbol más parsimonioso obtenido por búsqueda heurística en el análisis de secuencias ITS .....	37
<b>Figura 4-6:</b>	Dendograma construido con huellas genéticas generadas con las técnicas ap-PCR y DAF de la colección de <i>Colletotrichum</i> spp. aislada de ñame .....	39
<b>Figura 4-7:</b>	<b>A.</b> Representación de la contribución absoluta de los factores a la dispersión de los datos. <b>B.</b> Contribución de categorías a la construcción del primer y segundo factor .....	42
<b>Figura 4-8:</b>	Subnubes de las agrupaciones sobre el plano factorial por cada nivel de caracterización. <b>B.</b> Representación simultanea de la distribución de los datos y grupos formados en cada nivel de caracterización <b>C.</b> Gráfica B sin la categoría Marcadores.G3 .....	43
<b>Figura 4-9:</b>	Proyección de modalidades ilustrativas correspondientes a datos de procedencia de los aislamientos sobre el plano factorial .....	45
<b>Figura 4-10:</b>	Viabilidad de la suspensión conidial del aislamiento DC 37B, empleada en los ensayos de patogenicidad .....	46
<b>Figura 4-11:</b>	Primeros síntomas causados por el aislamiento DC 37B a las plántulas de ñame, 16 días postinfección .....	47
<b>Figura 4-12:</b>	Ensayos de virulencia bajo condiciones de invernadero.....	47
<b>Figura 4-13:</b>	Síntomas causados por el aislado DC 37B a la misma plántula de ñame ( <i>Dioscorea</i> spp.) <b>A.</b> 30 días y <b>B.</b> 60 días postinfección .....	48

## Lista de tablas

<b>Tabla 1-1:</b>	Parámetros reportados para el cultivo de ñame en Colombia 2011 (Agronet, 2013) .....	7
<b>Tabla 1-2:</b>	Composición nutricional del ñame (USDA, 2013) .....	11
<b>Tabla 3-1:</b>	Secuencias de iniciadores DAF empleados para la obtención de huellas genéticas de la colección .....	27
<b>Tabla 4-1:</b>	Descripción de categorías para las variables color de la colonia y forma de los conidios, empleadas para la caracterización de la colección .....	34
<b>Tabla 4-2:</b>	Características de los morfotipos discriminados mediante coeficiente de similitud de Gower .....	36
<b>Tabla 4-3:</b>	Matriz resumen generada a partir de los resultados de caracterización morfológica y molecular representados por dendogramas .....	41
<b>Tabla 4-4:</b>	Datos de procedencia de la colección de <i>C. gloeosporioides</i> aislada de ñame .....	44
<b>Tabla 4-5:</b>	Estadísticos de los datos de porcentaje de área foliar afectas obtenidos para el ensayo de virulencia y sus repeticiones .....	48
<b>Tabla 4-6:</b>	Escala de virulencia establecida para la especie <i>C. gloeosporioides</i> patógena de cultivos de ñame en Colombia .....	49

## Símbolos

Símbolo	Término	Símbolo	Término
µl	Microlitro	min	Minuto
µM	Micromolar	ml	Mililitros
cm	Centímetros	mm	Milímetros
g	Gramos	mM	Milimolar
h	Hora	ng	Nanogramo
ha	Hectárea	pb	Pares de base
IU	Unidad Internacional	ppm	Partes por millón
kcal	Kilocalorías	s	Segundo
kg	Kilogramos	®	Marca registrada
m	Metro	™	Trademark
mg	Miligramos	t	Tonelada







# Introducción

El ñame ha sido un producto de consumo tradicional representativo no solo económica y culturalmente, sino como parte de los productos que garantizan la seguridad alimentaria en países del trópico, dada su eficiencia para producir energía digestible (Chacón, 2005; Alvis *et al.*, 2008b). El provecho de este tubérculo se extiende a la industria farmacéutica, especies silvestres principalmente, son fuente de saponinas, diterpenoides y alcaloides; activos biológicos a los que se les atribuyen propiedades medicinales para el tratamiento de infecciones micóticas, artritis, diabetes mellitus, gastritis, inflamaciones, entre otras. Adicionalmente, por hidrólisis de la saponinas se obtiene la diosgenina precursor en la síntesis de anticonceptivos orales, hormonas y corticoides. El potencial de los hidrolizados de almidón de ñame como materia prima para la producción de cosméticos, alimentos procesados, bioplásticos y biocombustible, también ha sido reportado (Rodríguez, 2000; Sautour *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005; Tejada-Benítez *et al.*, 2007; Alvis *et al.*, 2008b; Montes *et al.*, 2008; Asiedu & Sartie, 2010; Vidal-Tovar, 2010; González-Vega, 2012).

El ñame está distribuido en regiones tropicales y subtropicales de alta pluviosidad. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción a nivel mundial en el periodo comprendido entre 1992 y 2012, ha sido liderada en un 96,04% por países africanos. El continente americano aporta el 2,72% de la producción mundial, siendo Colombia su mayor representante (FAOSTAT, 2013). El cultivo de ñame en Colombia es importante en la Costa Caribe, región que concentra el 90% de la producción nacional, principalmente en 26 municipios pertenecientes a los departamentos de Bolívar, Córdoba y Sucre. Allí existen núcleos productivos integrados por pequeños productores que explotan el cultivo en terrenos con áreas menores a 2 ha (Bustamante & Buitrago, 2006; ICA, 2009).

La demanda del producto se incrementa y cada vez es más preocupante desde el punto de vista sanitario, las plagas y enfermedades que afectan el cultivo. Actualmente la atención se centra en las enfermedades de origen fúngico, principalmente la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, la cual registra en Colombia un alto índice de daño agro-económico que en la década de los 90 alcanzó pérdidas hasta del 100% (Cerón-Rincón *et al.*, 2006; Reina-Aranza, 2012). El manejo cultural no es suficiente para el control de la antracnosis y su fuerte impacto ha llevado a que los productores de ñame adopten métodos tradicionales como la aplicación de fungicidas, muchas veces en forma exagerada para dar solución a los ataques del patógeno. Contradictoriamente lo que se ha logrado es dimensionar el problema a nivel de contaminación ambiental, aumento en los costos de producción y, contrario a extinguir el agente fúngico, se propicia que en respuesta adaptativa adquiera mecanismos que le confieren mayor virulencia (Pérez-Castro *et al.*, 2003; Aduramigba-Modupe *et al.*, 2008).

En Colombia, el Programa de Biotecnología Agrícola (PBA) financiado por el Gobierno de Holanda, desde el año 1997 ha liderado una estrategia rural participativa en los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, con el objetivo de crear innovación alrededor del cultivo del ñame y minimizar sus limitantes. La alianza de cooperación está conformada por pequeños agricultores, centros de investigación, autoridades del Estado, organismos gubernamentales y no gubernamentales (Pérez-Martínez & Clavijo-Ponce, 2012). El Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia en cabeza del grupo de investigación sobre el cultivo de ñame, como miembro de esta alianza, ha dirigido su interés al manejo de patógenos fúngicos, principalmente la especie *C. gloeosporioides*, objetivo dentro del cual se enmarca este proyecto de tesis, encaminado a generar conocimiento en cuanto a biología, variabilidad, diversidad y distribución del patógeno en cultivos de ñame colombianos, requisito para el diseño de estrategias prometedoras que garanticen eficiencia y sostenibilidad para la prevención y control de la antracnosis.

Aproximaciones al entendimiento de la composición de las poblaciones de *C. gloeosporioides* en diferentes hospederos, se han valido entre otras, de herramientas tradicionales basadas en la evaluación de características morfológica y herramientas moleculares basadas en el estudio del ADN (Abang *et al.*, 2003). La integración de diferentes visiones permite un acercamiento holístico, pertinente para enfrentar los nuevos desafíos en materia de adquisición de conocimientos con respecto a este patógeno, responsable del detrimento de la calidad de vida de los productores de ñame en Colombia.

## Objetivo General

Caracterizar morfológica y molecularmente aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* procedentes de cinco fincas productoras de ñame ubicadas en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar, y establecer una escala de virulencia para la evaluación de su patogenicidad.

## Objetivos Específicos

- Describir los rasgos macro y microscópicos característicos de los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Determinar perfiles moleculares de los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Establecer posibles relaciones entre características morfológicas y moleculares evaluadas para los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Establecer una escala de virulencia que permita caracterizar patogénicamente los aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal de antracnosis en ñame

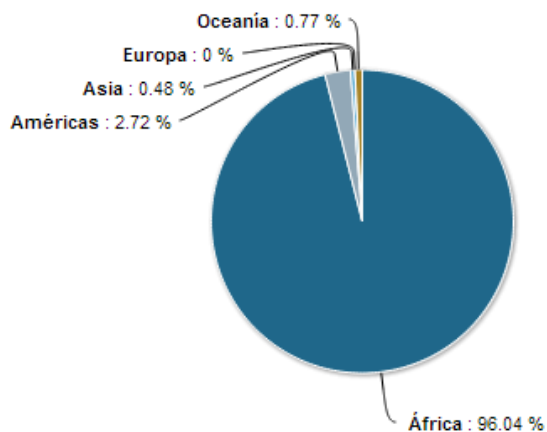


# 1.El cultivo de ñame

El ñame es un tubérculo distribuido en regiones tropicales y subtropicales de alta pluviosidad, es considerado uno de los tubérculos de mayor importancia agroeconómica a nivel mundial después de la papa, la yuca y la batata, constituyendo la principal fuente de ingresos y empleo en muchas zonas rurales del mundo (González-Vega, 2012; Botanical, 2013; FAOSTAT, 2013). Perteneció al género *Dioscorea*, el más representativo de los seis que conforman la familia Dioscoreaceae con cerca de 600 especies, de las cuales tan solo 12 son comestibles siendo las más importantes: *D. alata* (ñame oso, diamante, blanco o criollo) *D. rotundata* (ñame espinoso o portugués), *D. cayenensis* (ñame amarillo o de Guinea), *D. esculenta* (ñame bondad o papa), *D. trifida* (Yampí o ñame cush-cush) y *D. bulbifera*, (Sánchez-Vesga & Hernández-Vásquez, 1998; Rodríguez, 2000; Pérez *et al.*, 2005).

La especie *D. alata* es la más ampliamente distribuida y de mayor importancia económica a nivel mundial y junto con la especie *D. rotundata* son las más representativas en Colombia tanto por el área sembrada como por la demanda del tubérculo. *D. alata* es originaria del sudeste asiático y cuenta con las mejores características en cuanto a respuesta a la propagación, rendimiento, vigor y capacidad de almacenamiento; mientras que la especie *D. rotundata* fue domesticada en el occidente de África y aunque no iguala las propiedades de la especie *D. alata*, es menos susceptible a hongos fitopatógenos como *C. gloeosporioides* causante de la antracnosis. *D. trifida* es la única especie de ñame de origen americano, las demás fueron introducidas al continente alrededor del año 1550 D.C. en tiempos del comercio de esclavos africanos (Rodríguez, 2000; Abang *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2005; Egesi *et al.*, 2007; Mignouna *et al.*, 2008).

El ñame es producido en 59 países, de los cuales el 47,5% son de origen africano, el 22% pertenecen a Islas de las Antillas, el 15,3% a Oceanía, el 10,2% a América, el 3,4% en Asia y el 1,7% a Europa (Abang *et al.*, 2003; Reina-Aranza, 2012). La lista de producción según FAO para 2012, fue encabezada por Nigeria con 37'115.512 t, Ghana con 6'638.867 t, Costa de Marfil con 5'674.696 t y Benín con 2'366.000 t. Esta misma tendencia ha sido registrada desde 1992, reportando según la FAO una proporción de producción promedio liderada por el continente africano con un 96.04% (Figura 1-1).



**Figura 1-1:** Promedio de la proporción de producción por continente, 1992-2012 (FAOSTAT, 2013).

El ñame en América tropical es cultivado desde la época precolombina por pueblos indígenas, y pequeños y medianos agricultores (González-Vega, 2012). Para el periodo comprendido entre 1992 y 2012 el aporte promedio de los países americanos a la producción mundial apenas alcanzó un 2,72% (Figura 1-1). Según datos de la FAO Colombia con 361.034 t, Cuba con 349.692 t, Haití con 322.709 t, Brasil con 244.142 t y Venezuela con 102.140 t; fueron los países americanos que para el año 2012 hicieron parte de la lista de los veinte países con mayor producción a nivel mundial (Figura 1-2).

Los datos más recientes de la FAO reportan para Colombia en el 2012 un área cosechada del cultivo de 30.929 ha y un rendimiento de 11,7 t/ha. Según la Red de Información y Comunicación Estratégica del Sector Agropecuario-Colombia (Agronet) la tasa de crecimiento anual del cultivo hasta 2011 se calculó en 7,5% en producción, 6,0% en área cosechada y 1,5% en rendimiento. En Colombia según reportes del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), para el 2009 la exportación de ñame a Estados Unidos, Puerto Rico y algunas islas del Caribe se ha fortalecido, perfilándose como uno de los productos con mejores alternativas de exportación después de las flores, el banano, el café y la uchuva.

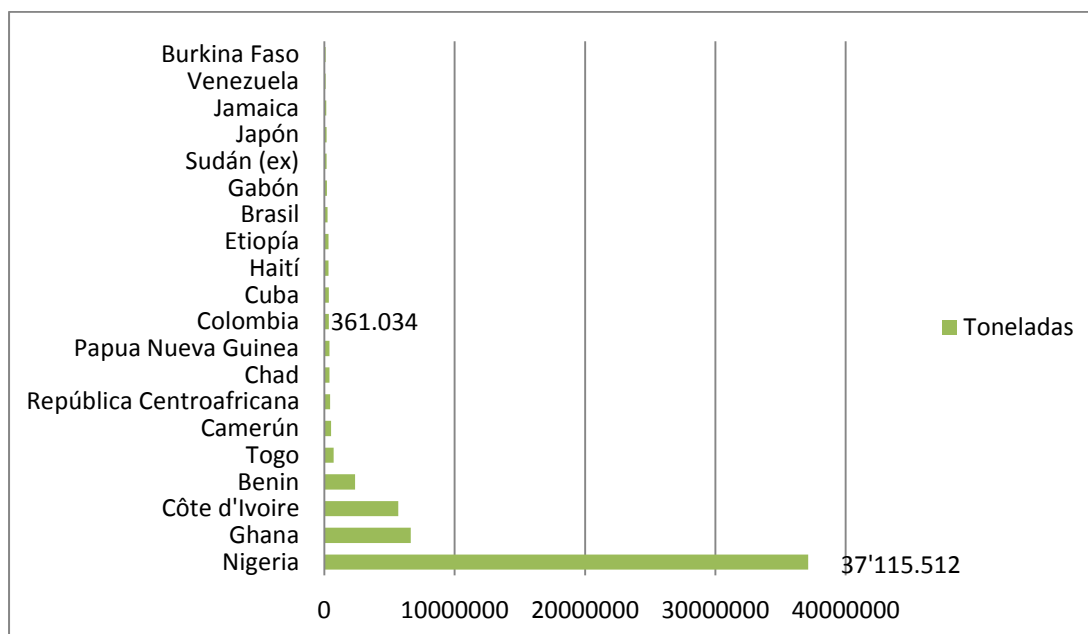


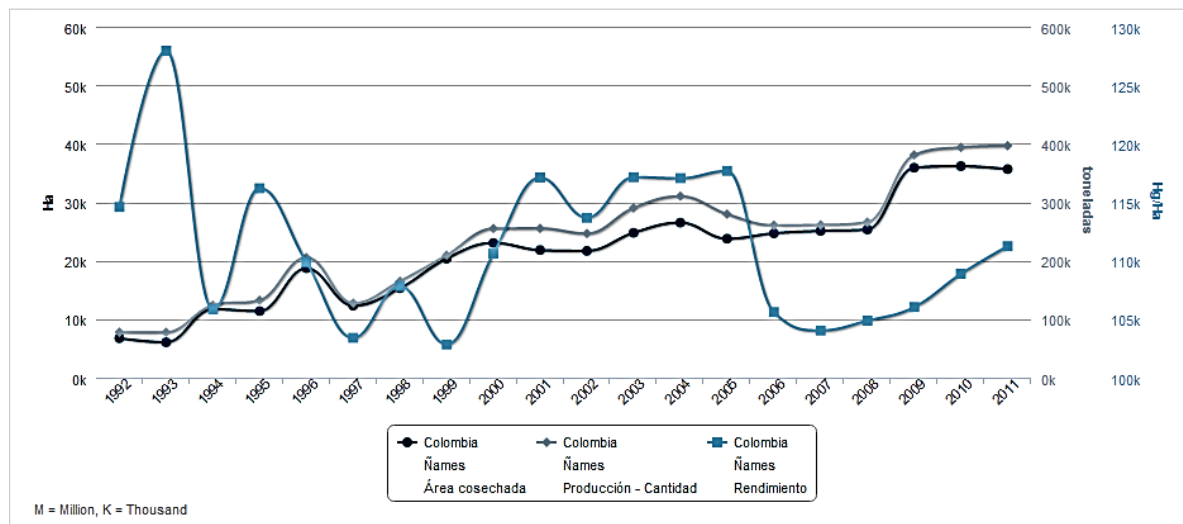
Figura 1-2: Lista de los 20 países con mayor producción a nivel mundial al 2012 (FAOSTAT, 2013).

La región del Caribe aporta más del 90% de la producción colombiana de ñame específicamente los departamentos de Córdoba, Bolívar y Sucre (Tabla 1-1). El área sembrada se concentra en 26 municipios entre los que se destacan Chalan, Coloso, Tolú Viejo, Ovejas, Carmen de Bolívar, Sampues, Morroa, San Antero, Coveñas, Lorica, Moñitos, San Pelayo, Cereté, Sincelejo, San Jacinto, San Juan Nepomuceno, San Antonio y Palmito; en donde existen núcleos productivos integrados por pequeños productores que explotan el cultivo en terrenos con áreas menores a dos hectáreas. En estas zonas, el tubérculo se ha constituido como un producto tradicional en las costumbres tanto productivas como alimenticias de los habitantes, en especial de la población rural (Bustamante & Buitrago, 2006; ICA, 2009). Otros departamentos como Antioquia, Chocó, Casanare y Vaupés tienen un participación minoritaria en la producción nacional (Reina-Aranza, 2012).

Tabla 1-1: Parámetros reportados para el cultivo de ñame en Colombia 2011 (Agronet, 2013).

Departamento	Área Cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)
<b>Bolívar</b>	15.492	179.983	11,6
<b>Córdoba</b>	9.691	102.920	10,6
<b>Sucre</b>	4.142	42.205	10,2
<b>Antioquia</b>	1.373	18.020	13,1
<b>Cesar</b>	487	7.305	15
<b>Chocó</b>	337	1.608	4,8
<b>Atlántico</b>	420	2.908	6,9
<b>Magdalena</b>	310	2.340	7,5
<b>La Guajira</b>	312	2.681	8,6
<b>Casanare</b>	4	11	2,8

A pesar del notable aumento en la producción y área cosechada de ñame en Colombia desde el año 2000 (Figura 1-3), aún sigue siendo considerado un cultivo huérfano en razón a que son pocos los esfuerzos que en investigación se realizan a nivel mundial y particularmente en Colombia.



**Figura 1-3:** Área sembrada, Producción y Rendimiento del cultivo de ñame en Colombia durante el periodo de 1992 a 2011 (FAOSTAT, 2013).

## 1.1 Descripción de la planta

La clasificación taxonómica del género *Dioscorea* según Janssens corresponde a (González-Vega, 2012):

**Reino:** Plantae  
**División:** Magnoliophyta  
**Clase:** Liliopsida  
**Orden:** Dioscoreales  
**Familia:** Dioscoreaceae  
**Género:** *Dioscorea*

El ñame es una planta angiosperma clasificada dentro de las monocotiledóneas, aunque fuertes indicios indican la existencia de antecesores con relaciones cercanas a las dicotiledóneas, entre ellos la presencia de vestigios de un segundo cotiledón en varias especies, la forma y venación de las hojas y la naturaleza de las inflorescencias (Mignouna *et al.*, 2007). Se define como una especie vegetal dioica, herbácea, perenne y trepadora; caracterizada por tener tubérculos subterráneos que constituyen el principal interés de la planta tanto para consumo como para semilla y tubérculos aéreos también conocidos como bulbillos. Se cree que los ñames son originarios de zonas forestales con alta humedad y baja radiación, por esta razón desarrollaron la capacidad de trepar como forma de adaptación a este ambiente (Rodríguez, 2000; González-Vega, 2012).

Las plantas se forman a partir de los cormos o tallos subterráneos los cuales constituyen el eje donde convergen los bejucos, el tubérculo y las raíces principales (González-Vega,



2012). De los bejucos se originan las hojas, raíces y estolones de la planta, estos últimos crecen en círculos sucesivos y pueden llegar a medir hasta 70 cm de largo, posteriormente se ensanchan formando el tubérculo. Los tubérculos son de superficie rugosa o lisa a veces con raicillas, la pulpa es uniforme, compacta y puede variar de color entre blanco, amarillo y morado. En cuanto a tamaño y forma también se encuentra gran diversidad, su peso comúnmente es de 300 a 400 g, sin embargo pueden alcanzar hasta 10 kg. Su textura puede ser esférica, fusiforme, claviforme y con ramificaciones cortas (FAO, 2006; Botanical, 2013).

Los tallos son delgados y crecen en forma de espiral siendo posible reconocer la especie de acuerdo con la dirección que estos tomen. Así, los tallos de *Dioscorea alata* se caracterizan por enrollarse hacia la derecha y los de *Dioscorea rotundata* hacia la izquierda. Esta última especie requiere de un tutor (palo o estaca) (FAO, 2006; González-Vega, 2012; Reina-Aranza, 2012).

Las hojas de ñame varían en forma dependiendo de la especie, pueden ser simples o lobuladas, con márgenes lisos, ápice puntiagudo, sin pubescencias, pecíolo largo alado o espinado y pueden medir hasta 25 cm de largo (González-Vega, 2012; Reina-Aranza, 2012). Las inflorescencias pueden ser estaminadas (masculinas) que comprenden racimos simples o muy ramificados con flores verdes de 4 a 6 mm de diámetro, o pistiladas (femeninas) que se encuentran en mayor proporción, constan de dos racimos que nacen de la misma axila con flores de 12 a 24 mm. La irregularidad en la temporada de floración entre géneros, dificulta el proceso de polinización y provoca la escasa producción de frutos y semillas en el cultivo (FAO, 2006; Botanical, 2013).

Las plantas de ñame poseen un sistema de raíces fibroso o en forma de cabellera que se desarrolla abundantemente durante las seis semanas después de la emergencia. Las raíces principales brotan del cormo y las secundarias del tubérculo (González-Vega, 2012).

Por otro lado, a nivel genético se conoce la diversidad del ñame estimada empleando marcadores moleculares tipo RAPD, AFLP, marcadores microsatélite y diferentes sistemas enzimáticos (Lebot *et al.*, 1998; Mignouna *et al.*, 2008). Hasta ahora se conoce la caracterización de variedades de ñame de germoplasma utilizadas en campo y silvestres, por medio de las técnicas SAMPL (Selective Amplification Microsatellite Polomorphic Loci) y la amplificación de huellas genéticas (DAF) en donde se registró una baja diversidad genética (Bustamante *et al.*, 2003; Bustamante & Buitrago, 2006). Así mismo, según Rivera-Jiménez y cols (2012) quienes caracterizaron con marcadores moleculares AFLP una colección de germoplasma conformada por 14 accesiones de la especie *Dioscorea alata* L. ubicada en la Universidad de Córdoba, establecieron una alta variabilidad genética para estas accesiones diferenciando cuatro grupos y dos subgrupos que se asocian con caracteres moleculares, botánicos y morfológicos. En Colombia se hace necesaria una caracterización más amplia y representativa de las variedades comerciales y silvestres, pues aún no es claro su nivel de diversidad.

## 1.2 Ciclo del cultivo

El ñame por ser una planta tropical se desarrolla óptimamente en altitudes desde el nivel del mar hasta 800 m y temperaturas medias de 18 a 34°C, siendo el rango óptimo entre 25 y 30°C. Para obtener máximos rendimientos necesita abundante agua en promedio 1200 a 2000 mm/año, los cinco primeros meses comprenden un período crítico en cuanto a condiciones de humedad, pasado este tiempo, el exceso de humedad puede ocasionar la pudrición de los tubérculos (González-Vega, 2012; Reina-Aranza, 2012).

La planta requiere abundante luz para obtener mayor producción, un período de 12 h de luz es adecuado. El ñame no toleran las heladas. Se desarrolla bien en suelos franco-arenosos, sueltos, profundos (más 0,6 m), con buen drenaje, buena fertilidad y pH de 5,5 a 6,0 (FAO, 2006; Botanical, 2013).

La preparación del terreno requiere diferentes prácticas dependiendo de la variedad a cultivar, para *D. alata* se recomienda el arado, rastrillado y hoyado; mientras que para *D. rotundata* se sugiere la pica, despalite y hoyado (Sánchez-Vesga & Hernández-Vásquez, 1998). El material vegetal empleado como semilla corresponde a los tubérculos con peso menor a 2 kg de la última cosecha o a los obtenidos por el método de capada que se basa en la extracción del tubérculo inmaduro para dejar expuesta la cabeza en el suelo e inducir la brotación de un pequeño tubérculo. En cualquiera de los casos los tubérculos son fraccionados en trozos de 100 a 150 g y plantados en surcos. Es necesario que el suelo contenga suficiente potasio para favorecer la formación de tubérculos (Reina-Aranza, 2012; Botanical, 2013).

El cultivo de ñame se considera como anual (Botanical, 2013), su siembra se planifica antes de la llegada de la temporada de lluvia, entre los meses de abril, mayo y junio, para cosechar entre noviembre, diciembre y enero. Es un cultivo poco tecnificado, dependiente en su totalidad de la mano de obra (ICA, 2009).

El crecimiento vegetativo inicia con la brotación que se produce entre la quinta y décima semana dependiendo de la especie, a continuación se desarrollan los tallos, hojas y nuevas raíces. El crecimiento reproductivo se da con el engrosamiento de los tuberculos y bulbillos, la disminución de la velocidad de crecimiento de tallos y el florecimiento de la planta. Por último se da la fase de maduración del tubérculo, la cual coincide con la época seca para permitir la pérdida de turgencia de las partes aéreas de la planta, el marchitamiento de tallos y hojas y la completa separación del tubérculo, rasgos que indican el tiempo de cosecha (Reina-Aranza, 2012; Botanical, 2013).

Los tubérculos de ñame con peso superior a 2 kg son destinados a consumo local y exportación, su embalaje se hace en costales o cajas para este último. Su almacenamiento además de requerir la sanidad del producto y la implementación de buenas prácticas de limpieza, obedece a la especie, así *D. alata* posee mejor capacidad de conservación, permitiendo realizar labores de selección, limpieza y almacenamiento del producto; mientras que *D. rotundata* se comercializa inmediatamente después de la cosecha, ya que si se almacena pierde peso rápidamente (Sánchez-Vesga & Hernández-Vásquez, 1998; Reina-Aranza, 2012).

Generalmente los cultivos se establecen como sistemas asociados, las principales especies en asocio son el maíz y la yuca, aunque se han dado casos de cultivo de ñame

espino alternado con sandía, sirviendo este último de cobertura al primero (Sánchez-Vesga & Hernández-Vásquez, 1998).

### 1.3 Usos

El ñame ha sido un producto de consumo tradicional representativo no solo económica y culturalmente, sino como parte de los productos que garantizan la seguridad alimentaria a 300 millones de personas de bajos recursos en países del trópico (Mignouna *et al.*, 2008).

El valor alimenticio del ñame lo convierten en un sustituto de la papa y la yuca, ocupando el segundo lugar después de la papa en eficiencia para producir energía digestible, gracias a su alta composición de almidón que se traduce en fuente rica de carbohidratos, acompañada además de grandes proporciones de fósforo, potasio, vitaminas A y C (Tabla 1-2) (Chacón, 2005; Alvis *et al.*, 2008b; Montes *et al.*, 2008). El almidón de este tubérculo es reconocido por su estabilidad a altas temperaturas y bajo pH (Alvis *et al.*, 2008a).

Como producto alimenticio el ñame es preparado de diversas formas frito, asado, cocido, en puré, en sopas, guisos, tortas, dulces, como chicha o "masato" y acompañado de queso, cuajada o suero de leche (mote de queso). En África, es popular el "fufu", una preparación con consistencia de masa elástica elaborada con ñame cocido, molido y amasado en un mortero de madera (Amusa *et al.*, 2003; FAO, 2006; Alvis *et al.*, 2008a; González-Vega, 2012).

**Tabla 1-2:** Composición nutricional del ñame (USDA, 2013).

Nutriente	Unidad	Valor/100 g	Nutriente	Unidad	Valor/100 g
<b>Agua</b>	g	69,60	<b>Potasio</b>	mg	816
<b>Calorías</b>	kcal	118	<b>Sodio</b>	mg	9
<b>Proteínas</b>	g	1,53	<b>Zinc</b>	mg	0,24
<b>Lípidos Totales</b>	g	0,17	<b>Vitamina C</b>	mg	17,1
<b>Carbohidratos</b>	g	27,88	<b>Tiamina</b>	mg	0,112
<b>Fibra</b>	g	4,1	<b>Riboflavina</b>	mg	0,032
<b>Azúcares</b>	g	0,50	<b>Niacina</b>	mg	0,552
<b>Calcio</b>	mg	17	<b>Vitamina B-6</b>	mg	0,293
<b>Hierro</b>	mg	0,54	<b>Folato</b>	µg	23
<b>Magnesio</b>	mg	21	<b>Vitamina A</b>	IU	138
<b>Fósforo</b>	mg	55	<b>Vitamina E</b>	mg	0,35

Las especies silvestres, principalmente, son útiles en la industria farmacéutica como fuente de componentes activos biológicos, en especial de saponinas, diterpenoides y alcaloides a los que se les atribuyen propiedades medicinales para el tratamiento de infecciones micóticas, influenza, artritis, reuma, diabetes mellitus, gastritis, inflamaciones, fiebre, alergias, obesidad, irritaciones, espasmos y síntomas de la menopausia (Sautour *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005; Alvis *et al.*, 2008a; Alvis *et al.*, 2008b; González-Vega, 2012). Adicionalmente, por hidrólisis de la saponinas se obtiene la diosgenina precursor en la síntesis de anticonceptivos orales, hormonas y corticoides (Rodríguez, 2000;

Tejada-Benítez *et al.*, 2007; Alvis *et al.*, 2008a; Mignouna *et al.*, 2008; Asiedu & Sartie, 2010; González-Vega, 2012).

Investigaciones también demuestran el gran potencial de los hidrolizados del almidón de ñame como una alternativa para responder a las demandas de procesos industriales tales como la fabricación de cosméticos; productos de panadería, salsas, yogures, mermeladas y jarabes edulcorantes intermedios; concentrados para animales; fabricación de bioplásticos y posiblemente en la fabricación de biocombustibles, aplicación discutida recientemente (Tejada-Benítez *et al.*, 2007; Alvis *et al.*, 2008a; Alvis *et al.*, 2008b; Mignouna *et al.*, 2008; Montes *et al.*, 2008; Vidal-Tovar, 2010; González-Vega, 2012).

## 1.4 Limitantes del cultivo de ñame

El ñame es un cultivo con un fuerte factor estacional, lo que constituye un obstáculo para que el mercado del producto sea constante. La sobreoferta en épocas de cosecha sumado a la falta de infraestructura para el almacenamiento del tubérculo, provoca reducción de precios, caída de la demanda, pérdidas postcosecha (entre 30 y 40%) e incapacidad para transformar el producto (Sánchez-Vesga & Hernández-Vásquez, 1998; Alvis *et al.*, 2008a). En cuanto a la disponibilidad de material para siembra, alternativas a la propagación por semilla sexual como la propagación vegetativa, responden a las necesidades evitando las limitantes asociadas al dioicismo de la especie, a su floración escasa y asincrónica (Amusa *et al.*, 2003; Mignouna *et al.*, 2008; González-Vega, 2012).

Otra limitante para el cultivo se relaciona con la calidad e inocuidad de las semillas, comúnmente éstas son seleccionadas de la cosecha anterior, aumentando en gran proporción la posibilidad de transmitir y dispersar enfermedades de un ciclo a otro. Los mayores problemas fitosanitarios en los cultivos de ñame son causados por su susceptibilidad a hongos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia pallescens*, *Curvularia eragrostides*, *Pestalotia* sp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*) y virus (mosaico del ñame – YMV, virus del ñame de agua) (Amusa *et al.*, 2003; Egesi *et al.*, 2007; ICA, 2009), pero las enfermedades de origen fúngico son las que más han causado pérdidas en Colombia, siendo el género *Colletotrichum* y la especie *gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis, la más devastadora a nivel mundial (Abang *et al.*, 2003; Cerón-Rincón *et al.*, 2006).

Las etapas de almacenamiento y comercialización también son críticas en cuanto a condiciones de fitosanidad para el tubérculo, patógenos fúngicos pueden penetrarlo a través de heridas e infectar el tejido causando su pudrición, la cual según los síntomas observados y los patógenos involucrados en la enfermedad se puede dividir en tres clases. i) Pudrición seca: asociada a *Botryodiplodia theobromae*, *Aspergillus tamari*, *Penicillium oxalicum*, *P. cyclopium*, *P. italicum*, *Fusarium oxysporium* y *F. solani*. ii) Pudrición blanda: asociada a *Rhizopus nigricans*, *Sclerotium rolfsii*, *Mucor circinelloides* y *Trichoderma viridae*. iii) Pudrición húmeda: asociada a *Erwinia carotovora* (Amusa *et al.*, 2003).

## 2. Antracnosis

La palabra antracnosis derivada del griego anthrax (“carbón”) significa ennegrecimiento y con ella se denomina al grupo de enfermedades que atacan follaje, tallos o frutos, produciendo manchas oscuras o lesiones sumidas de borde elevado. La antracnosis es ocasionada por hongos que producen sus conidios (esporas asexuales) dentro de acérvulos (cuerpos fructíferos) presentes en la lesión (Agrios, 2005).

Gran parte de los casos reportados de antracnosis tienen como agente etiológico el anamorfo de *Glomerella*, *Colletotrichum*. Según Dean y cols (2012) el número de especies de este género varía de 29 a cerca de 700 dependiendo de la interpretación taxonómica (Sutton, 1992). *Colletotrichum* spp. como patógeno es reconocido por ser altamente destructivo, atacar con gran severidad un amplio rango de hospederos (cereales, pastos, legumbres, vegetales, ornamentales y cultivos perennes incluidos árboles frutales) en los trópicos y subtropicos y poseer un gran potencial de infección cruzada, esta última consecuencia de la capacidad infectiva de varias de sus especies sobre un único hospedero o por la facultad de una especie para atacar diversos hospederos (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Talhinhos *et al.*, 2005).

Las especies de *Colletotrichum* proveen un excelente modelo para el estudio de las interacciones hongo patógeno y en los últimos años su entendimiento ha sido de interés colectivo (Munch *et al.*, 2008; Cannon *et al.*, 2012). Hasta el momento han sido liberadas las secuencias del genoma de las especies *C. graminicola*, *C. higginsianum*, y *C. orbiculare*, adicionalmente otros proyectos están siendo ejecutados en dirección al conocimiento de la sistemática, ecología e interacción del género (Damm *et al.*, 2010; Cannon *et al.*, 2012).

Tal es el reconocimiento que se ha dado al género que en el 2012 fue incluido en la lista top 10 de los principales patógenos de plantas en función de su importancia científica y económica, ocupando el octavo puesto por votación de la comunidad científica (Dean *et al.*, 2012).

### 2.1 *Colletotrichum gloeosporioides*: agente etiológico de la antracnosis en ñame

En ñame la antracnosis causada por la especie fúngica *Colletotrichum gloeosporioides* es la enfermedad más limitante del cultivo a nivel mundial. La enfermedad puede afectar hojas, peciolas y tallos de la planta, conllevando a una extensiva necrosis del follaje. Pérdidas de productividad de un 80% e incluso de la totalidad de las cosechas han sido reportadas en el occidente de África, el Caribe, la India y el Pacífico sur (Abang *et al.*,

2002; Abang *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2004, Agrios, 2005; Abang *et al.*, 2006). En Colombia esta enfermedad causó las mayores pérdidas registradas para el cultivo en el país con una dramática reducción del área sembrada que pasó de 25.000 ha en 1989 a 4.547 ha en 1990, la tasa de crecimiento promedio anual durante este periodo de tiempo fue de aproximadamente 0,3% (Cerón-Rincón *et al.*, 2006; Reina-Aranza, 2012), extremadamente baja en comparación con el 4,8% calculado según datos de Agronet para el periodo comprendido entre 1996 y 2010.

La especie *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfo: *Glomerella cingulata*) fue clasificada taxonómicamente según el Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI, 2013) dentro de:

**Dominio:** Eukaryota

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Subphylum:** Pezizomycotina

**Clase:** Sordariomycetes

**Subclase:** Hypocreomycetidae

**Orden:** Glomerellales

**Familia:** Glomerellaceae

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

**Especie:** *Cingulata* (anamorfo: *gloeosporioides*)

Esta especie fue descrita en sus inicios como *Vermicularia gloeosporioides* por Penzig en el año 1882, cuando fue aislada de hojas de un cítrico en Italia (Bustamante, 2006; Hyde *et al.*, 2009). Es reconocida como polimórfica que reúne subgrupos, los cuales varían en cuanto a su grado de virulencia, su especificidad por un hospedero y su composición a nivel genético. En 1957 Von Arx (Citado por Hyde *et al.*, 2009) reconoció por primera vez esta propiedad de *C. gloeosporioides*, ubicando en sinonimia a al menos 600 taxas, algunas de las cuales fueron reconocidas más adelante como nuevas especies, la gran mayoría no han sido revaluadas, principalmente por la no existencia del holotipo o isotipo del cual se realizaron las respectivas descripciones (Hyde *et al.*, 2009). Por tanto, siguen presentándose ambigüedades y contradicciones que han conducido a la constante discusión por la comunidad científica de la base de descripción de esta especie (Weir *et al.*, 2012), hecho que incluso llevó a su epitipificación en el 2008 por Cannon y cols (citado por Damm *et al.*, 2010).

Actualmente, *C. gloeosporioides* en su sentido más amplio "*sensu lato*" es considerado un complejo de especies con una amplia diversidad genética y biológica, agrupado tanto por similitud morfológica como genética (secuencias ITS) (Damm *et al.*, 2010). Aunque existen evidencias que muestran distintos linajes filogenéticos para algunas de las especies del complejo *C. gloeosporioides sensu lato* con altos soportes estadísticos (Phoulivong *et al.*, 2010), en el año 2012 Weir y cols, establecieron 22 especies más una subespecie dentro del complejo con base en filogenias multigenes (actina, calmodulina, quitina sintasa, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, espaciador interno transcrito, glutamina sintetasa, manganeso superóxido dimutasa y  $\beta$ -tubulina 2). Las especies corresponden a taxones ya descritos: *C. asianum*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. horii*, *C. kahawae* subsp. *kahawae*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C. psidii*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*, y *C. xanthorrhoeae*, y a nuevos taxones *C. aenigma*, *C. aeschynomenes*, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C. alatae*, *C. clidemiae*, *C. kahawae* subsp. *Ciggaro* y *C. salsolae*.

Con respecto a las poblaciones de *C. gloeosporioides* asociadas con antracnosis foliar en ñame, se tiene la descripción de cuatro formas reportadas en Nigeria (Abang *et al.*, 2002; Abang *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2009).

- **SGG** (slow growing grey): se caracteriza por la presencia de micelio oliváceo-amarillento con masas de esporas naranja brillante alrededor del centro de la colonia (reverso: verdoso oliváceo oscuro), micelio aéreo denso y lanoso con mechones tendientes hacia blanco grisáceo en la maduración, crecimiento lento (6.8 mm/día), esporulación abundante y alta virulencia. Perfil de metabolitos secundarios clasificado como quimiotipo A o B.
- **FGS** (fast growing salmon): micelio salmón amarillento tendiente hacia diferentes formas de grises en la maduración (reverso), micelio aéreo lanoso, crecimiento rápido (10.4 mm/día), esporulación abundante frecuentemente en anillos concéntricos que son altamente variables en número y disposición, a veces forman sectores monoesporulados con micelio blanco que usualmente es escaso. Los aislados de este grupo son considerados moderadamente virulentos y pertenecientes al quimiotipo A o B.
- **FGO** (fast growing olive): micelio oliva verde oscuro con masas de esporas escasas color salmón-amarillento al reverso, lanoso, de crecimiento rápido (10.7 mm/día) y esporulación moderada. Grupo clasificado como moderadamente virulento.
- **FGG** (fast growing grey): micelio oliva en el centro, oliva amarillento hacia el margen, masa de esporas gris a gris oscuro, micelio aéreo lanoso, crecimiento rápido (10.4 mm/día) y esporulación escasa. Su virulencia es baja o nula y se clasificó como quimiotipo C según su perfil de metabolitos secundarios. Se cree que esta forma probablemente pueda representar una especie diferente dados los resultados obtenidos por análisis de secuencias de espaciadores internos transcritos (ITS).

Adicionalmente, aislados clasificados como SGG, FGS y FGG fueron evaluados para establecer grupos de compatibilidad vegetativa (VCG), encontrando alta variabilidad y no correlación entre VCGs y las formas mencionadas (Abang *et al.*, 2004).

Para este estudio es importante tener en cuenta el nuevo taxón *C. alatae*, miembro del complejo *C. gloeosporioides sensu lato*, etimológicamente referido como la especie fúngica que ataca *Dioscorea alata* en la India. Se caracteriza por su micelio aéreo escaso pero denso de color gris pálido, acérvulos negros dispersos, masas conidiales naranja cercanas al centro; al reverso fondo naranja rosáceo con parches de pigmento gris cerca al centro de la colonia, crecimiento de 30-40 mm en PDA después de 10 días y conidios cilíndricos con lados rectos y extremos redondos o en algunos casos estrechos (Cannon *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012).

## 2.2 Determinantes de patogenicidad

- Formación del apresorio

Esta constituye la estrategia que permite a las especies de *Colletotrichum* penetrar directamente el tejido vegetal. El mecanismo ejercido por esta estructura altamente especializada se hace posible gracias a su composición, al interior por glicerol y en su pared celular por capas rígidas dobles o triples compuestas por distintos carbohidratos y melanina, que en conjunto crean una alta presión de turgencia estimada en más de 53

bar (5.3 MPa), capaz de inducir la formación de puntos de penetración (pegs) responsables de la perforación física de las células epidermales de la planta. Además de contribuir al proceso penetrativo la acumulación de melanina brinda protección al apresorio contra la irradiación y le otorga una permeabilidad selectiva. Una de las características distintivas de esta estructura es su capacidad de adhesión a la planta u otras superficies, ejercida por una matriz de esporas y la secreción de material mucilaginoso que en conjunto actúan como protectores durante la adhesión, haciendo posible el contacto permanente hasta el momento de la penetración vía enzimática o mecánica. Al menos tres genes son esenciales en la biosíntesis de melanina y por ende fundamentales en el desarrollo de la antracnosis, cualquier deficiencia en la producción de melanina trae como consecuencia la pérdida de patogenicidad (Idnurm & Howlett, 2001; Shen *et al.*, 2001; Agrios, 2005; Munch *et al.*, 2008).

Entre otros genes reportados en la literatura con asociación a funciones del apresorio, se puede mencionar una secuencia correspondientes a un ADNc denominado *cap22* identificado en 1995 por Hwang y cols, posiblemente determinante en la función del apresorio. Por otro lado, el gen *cap20* fue descrito en la especie *C. gloeosporioides* expresado durante la formación del apresorio, junto a su ADNc fue clonado y secuenciado revelando un marco abierto de lectura codificante para un polipéptido de 183 aminoácidos, el cual no tuvo homología significativa con ninguna proteína conocida. Su importante rol en la infección del hospedero fue sugerida por la detección de sus transcritos en la superficie e interior de tomates infectados con el hongo. Las mutantes con disrupción del gen *cap20* mostraron una drástica disminución de la virulencia en frutos de tomate y aguacate (Hwang *et al.*, 1995). Al 2010 el trabajo de investigación realizado por Barreto-Macié indicó la posible presencia de variaciones del gen *cap20* dentro de la especie *C. gloeosporioides* asociadas al hospedero, y demostró su presencia en las especies *C. boninense*, *C. capsici* y *C. dematium*.

- Degradación de la pared celular

La inmunidad vegetal cuenta con una primera fase de defensa o barrera física que evita la entrada de exógenos, la cual incluye la pared celular, la cutina y la pectina. Dicha protección constituye un importante blanco para los patógenos, que han desarrollado estrategias como la síntesis de enzimas degradadoras de la pared celular o CWDEs por sus siglas en inglés (*Cell Wall Degrading Enzymes*). La producción de endopoligalacturonasas, pectato liasas (PL), pectín liasas A (*pnlA*), pectín liasas B (*pnlB*) y pectín metil esterases ha sido reportada en *C. gloeosporioides* durante la colonización del tejido infectado, además existen evidencias de la asociación entre la secreción de amonio por parte del hongo como estrategia para incrementar el pH y la consecuente producción de algunas de estas enzimas, involucradas en la degradación de pectinas, considerándose así la secreción de amonio un factor de virulencia que aumenta la capacidad patogénica de la especie, posiblemente mediando el paso de estadio biotrófico a necrotrofico en la colonización del hospedero (Bowen *et al.*, 1995; Shih *et al.*, 2000; Yakoby *et al.*, 2000; Prusky *et al.*, 2001; Yakoby *et al.*, 2001; Cerón-Rincón *et al.*, 2006; Kramer-Haimovich *et al.*, 2006). El rol que cumplen las CWDEs en la patogénesis y los genes que la codifican, son tópicos que han tratado de dilucidarse, tarea difícil ya que estas son codificadas por una familia multigénica o por genes no asociados. Estudios realizados por Yacoby y cols en 2001, han permitido sugerir al gen *peIB* codificante para una pectato liasa, como un importante factor de virulencia, conclusión soportada por la observación de reducción de síntomas en aguacate con mutantes del hongo que presentan disrupción del gen.



- Producción de toxinas

En diferentes especies del género *Colletotrichum* se ha reportado la producción de metabolitos secundarios tóxicos, entre ellos la colletotricina, coletopirona, aspergilomarasmina y ferricrocina, presentes en un amplio rango de hospederos (Munch *et al.*, 2008). La posible acción especie específica de las fitotoxinas y su papel en el desarrollo de la antracnosis en ñame, ha dirigido investigaciones al conocimiento de sus efectos, estructura y composición (Alleyne, 2001). Abang y cols (2009) purificaron y caracterizaron una fracción altamente tóxica tipo péptido de bajo peso molecular y considerada termoestable, de aislados de *C. gloeosporioides* caracterizados previamente por el mismo autor como alta y moderadamente virulentos (SGG y FGS). Estos resultados sugirieron la importancia de la fracción fitotóxica de *C. gloeosporioides* en la patogénesis en ñame, a pesar de observarse su inespecificidad, ya que también fue producida en interacción con los hospederos yuca y cocombro. Ensayos con aislados de *C. gloeosporioides* y especies de ñame que diferían en su nivel de virulencia y resistencia, respectivamente, indicaron que la alta virulencia natural de SGG puede estar relacionada con la alta fitotoxicidad de sus toxinas.

- Señalización de la patogenicidad

La señalización como mecanismo desencadenante de respuesta a cambios ambientales mediante la alteración de la expresión génica, ha probado ser necesaria para el desarrollo de la patogenicidad en varios patógenos fúngicos. En el caso de *C. gloeosporioides* y otros fitopatógenos, el proceso de diferenciación de conidio a apresorio requiere de propiedades del hospedero que desencadenan la respuesta del hongo. Entre ellas la segregación de etileno que actúa fisiológicamente como hormona de maduración en plantas y la composición cerosa de la superficie vegetal.

Una vez inducido el proceso de diferenciación, la maquinaria molecular del hongo activa una cadena de señales que se traducen en respuesta patogénica. Kim y cols (2000), consiguieron la clonación de una proteína quinasa quinasa activada por mitógeno (MEK) de *C. gloeosporioides* llamada CgMEK y estudiaron su rol en la inducción de procesos de desarrollo involucrados en patogénesis. Los resultados mostraron que la disrupción del gen *CgMEK* provoca, tanto pérdida en la habilidad del hongo para forma apresorio en respuesta a las señales del hospedero, como pérdida de virulencia. De otro lado el análisis citoquímico y de cambios morfológicos ocurridos durante la germinación de los conidios, sugirieron en este estudio la intervención del gen *CgMEK* en la división celular polarizada y la diferenciación del tubo germinativo a apresorio, procesos requeridos para la formación del apresorio.

Los genes involucrados en estas rutas de señalización parecen codificar la misma secuencia de aminoácidos en varios hongos, pero las rutas de señalización y sus interconexiones parecen ser más específicas (Agrios, 2005).

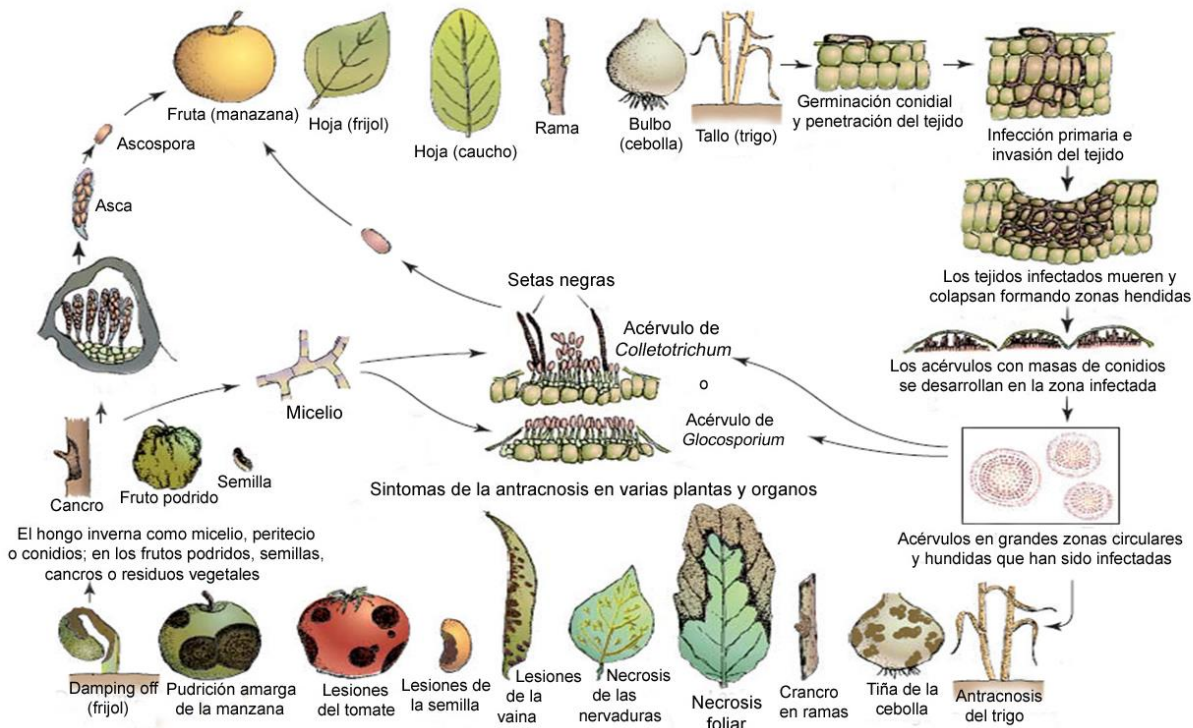
- Otros genes que pueden estar involucrados en el proceso de patogenicidad

Los genes de patogenicidad definidos por Idnurm y Howlett (2001), como aquellos necesarios para el desarrollo de la enfermedad, pero no esenciales para que el patógeno complete su ciclo de vida *in vitro*, son de gran interés porque podrían convertirse en blancos para el control de enfermedades. En *C. gloeosporioides* además de los genes ya mencionados, se tienen reportes de la presencia del gen *CgDN3* que codifica una proteína de 74 aminoácidos, la cual fue inducida por limitación de nitrógeno y expresada

en estadios tempranos (biotrofia) de la infección en la leguminosa *Stylosanthes guianensis*. La disrupción de *CgDN3* condujo a la producción de una respuesta hipersensible en el hospedero inoculado y a una disminución de patogenicidad, por tanto este gen representa un posible blanco para control de *C. gloeosporioides* e incluso otras especies de este género fitopatógeno (Stephenson *et al.*, 2000; Munch *et al.*, 2008).

## 2.3 Ciclo de la enfermedad

El ciclo de la antracnosis es similar en la gran gama de plantas a las que ataca (Figura 2-1). Los conidios una vez establecidos en la superficie del hospedero forman un tubo germinativo corto que transcurridas de 12 a 24 h inicia su diferenciación a apresorio, esta etapa es desencadenada por la síntesis de proteínas específicas en el patógeno inducidas por señalización de la planta hospedera. Infecciones originadas por ascosporas rara vez se presentan pues suelen ser poco eficientes energéticamente (Hwang *et al.*, 1995; Cano *et al.*, 2004; Agrios, 2005; Munch *et al.*, 2008).

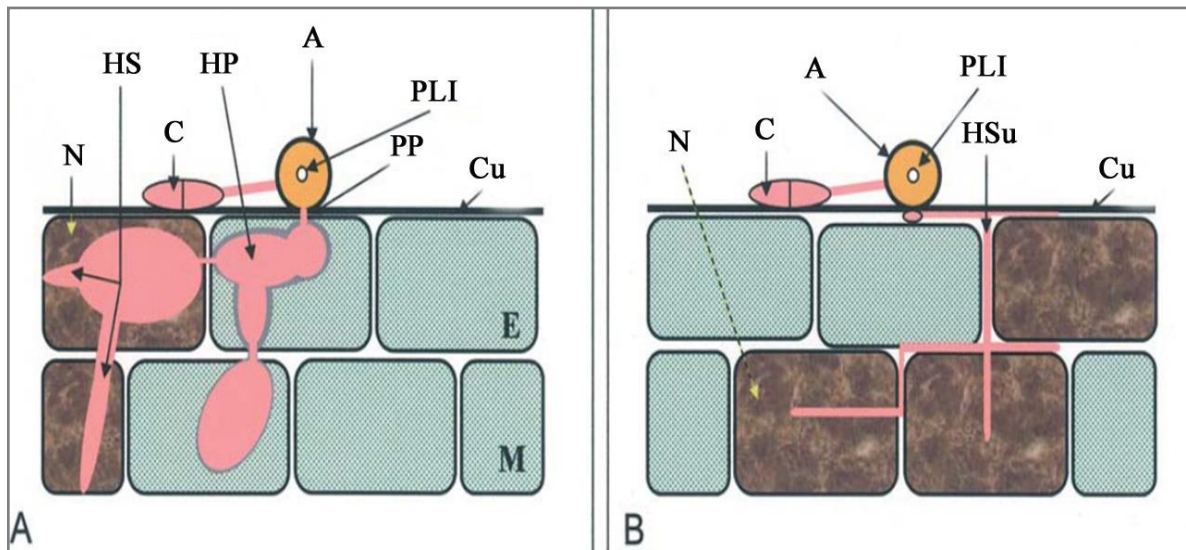


**Figura 2-1:** Ciclo de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* (Agrios, 2005).

A continuación se da la maduración del apresorio por inclusión de capas de melanina y síntesis de componentes osmóticos activos (Agrios, 2005; Munch *et al.*, 2008) y se produce un poro de penetración, del cual emerge un punto delgado de crecimiento o peg para penetrar la cutícula del hospedero y como resultado un punto de luz interior puede ser identificado en el apresorio (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). A partir de este momento el hongo puede adoptar dos tipos de estrategias de infección (Figura 2-2):

- Hemibiotrofia intracelular

Este tipo de colonización comprende dos fases de nutrición, la primera llamada biótrofa que es de corta duración y está presente durante los estadios tempranos de la colonización fúngica, se asocia con hifas primarias intracelulares gruesas o vesículas multilobuladas que colonizan células epidermales y mesófilas adyacentes. Esta etapa se caracteriza por ser asintomática postpenetrativa, en ella el patógeno restringe la expresión enzimática asociada a degradación de la pared vegetal, limitándose a obtener alimento mientras las células del hospedero penetradas permanecen viables. La segunda conocida como necrótrofa ocurre en las etapas tardías de la infección, se caracteriza por ser destructiva y se asocia con hifas secundarias angostas, la cuales se ramifican a través del tejido hospedante inter e intracelularmente, mientras secretan enzimas para degradar la pared celular vegetal causando la muerte de las células hospederas que posteriormente son usadas como alimento (Figura 2-2A). Finaliza con la aparición de síntomas de la enfermedad y producción de conidios por parte del patógeno (Stephenson *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2001; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004; Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2005; Cerón-Rincón *et al.*, 2006; Munch *et al.*, 2008; Than *et al.*, 2008).



**Figura 2-2:** Estrategias de colonización del género *Colletotrichum*. **A.** Hemibiotrofia Intracelular: **B.** Necrotrofia intramural subcuticular. Necrotrofia. (N), Hifa Secundaria (HS), Conidio (C), Hifa primaria (HP), Apresorio (A), Punto de Luz Interior (PLI), Poro de Penetración y Peg (PP), Cutícula (Cu), Células Epidermales (E), Células Mesófilas (M), Hifas Subcuticulares (HSu) (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004).

- Necrotrofia intramural subcuticular

En esta etapa una vez el patógeno penetra la cutícula se restringe su entrada inmediata al lumen celular, iniciando en cambio una extensión mediante hifas subcuticulares e intramurales debajo de la cutícula, entre la pared periclinal y anticlinal de las células epidermales. No es claro si las células del hospedante permanecen vivas, pero los síntomas solo aparecen hasta 24 h después de la penetración. Después del breve período asintomático, el hongo comienza a expandirse rápidamente a través del tejido del

hospedante intra e intercelularmente, matando las células vegetales y degradando las paredes celulares (Figura 2-2B) (Wharton and Diéguez-Urbeondo, 2004; Rodríguez-González, 2007).

En cualquiera de las dos estrategias expuestas, el micelio forma acérvulos debajo de la cutícula dispuestos en forma concentrica o dispersa en las lesiones y al romperse son liberados conidios para una vez más iniciar las infecciones (Figura 2-1). El hongo también puede albergarse en residuos en descomposición; tallos, hojas y frutos enfermos; canchales de perennes; semillas de plantas anuales; hospederos alternativos (como endófito) y como parásito vegetal a nivel subepidérmico en forma de acérvulos, en donde puede sobrevivir en climas secos (Figura 2-1). En climas cálidos húmedos los conidios pueden retomar su ciclo de vida y ser diseminados a través de la lluvia, viento e insectos. Adicionalmente las malas prácticas de manejo en cuanto al tratamiento de restos de material vegetal, herramientas o semillas contaminados, contribuyen significativamente a la dispersión del patógeno. En el cultivo de ñame esta última fuente de asentamiento del hongo representa la mayor causa de su dispersión, ya la semilla en este caso los tubérculos, son frecuentemente material de intercambio entre zonas productoras. (Agris, 2005; Amusa *et al.*, 2005; Ripoche *et al.*, 2008).

## 2.4 Síntomas de antracnosis en ñame

La literatura describe una variedad de síntomas asociados a antracnosis en ñame y por ende términos usados para definirlos, quemadura, tizón, mancha o punto necrótico, muerte regresiva, entre los más comunes (Abang *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2003; Cerón-Rincón *et al.*, 2006).

Según Winch y cols (1984), las lesiones típicas son café oscuras casi negras, irregulares o aproximadamente circulares de 2 a 20 mm de diámetro, estas pueden coalescer y expandirse para formar largas manchas que reducen notablemente el área fotosintética, produciendo necrosis extensiva de las hojas y muerte regresiva del tallo (Abang *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2003). En ensayos bajo condiciones controladas se han reportado dos distintos síntomas en ñame, el primero fue descrito como lesiones necróticas circulares, discretas, café oscuras a negras, generalmente no coalescentes, usualmente con un halo clorótico brillante alrededor que sugiere la probabilidad del efecto de una toxina inducida por el patógeno. El segundo se caracterizó por parches cloróticos diversos, irregulares, generalmente coalescentes con una coloración única, café y superficial de las hojas (Abang *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2009).

Ayodele y cols en el 2004, también reportaron la presencia de diferentes síntomas causados por *C. gloeosporioides*, en hojas ñame colectadas de 900 genotipos en Nigeria. Estos se clasificaron en 7 tipos de manchas o puntos necróticos y 4 tipos de tizón, descritos como:

- Punto necrótico tipo 1: punto regular con halo amarillo
- Punto necrótico tipo 2: punto marrón largo irregular con halo amarillo
- Punto necrótico tipo 3: punto marrón largo con anillos concéntricos y centro gris
- Punto necrótico tipo 4: punto marrón claro rodeado por un anillo marrón oscuro
- Punto necrótico tipo 5: puntos dispersos en la lámina rodeados de halos amarillos
- Punto necrótico tipo 6: puntos grises con borde marrón oscuro que se fusionan para formar lesiones y causar la deformación del borde de la lámina foliar

- Punto necrótico tipo 7: puntos marrón con centro marrón oscuro
- Tizón tipo 1: lesión marrón larga en el nervio central, rodeada por una mancha larga amarilla
- Tizón tipo 2: lesión larga marrón en el margen de la lámina rodeada por una mancha amarilla
- Tizón tipo 3: lesión larga gris rodeada por una mancha verde oliva en el ápice de la hoja que se extiende hacia adentro.
- Tizón tipo 4: lesión larga gris rodeada por una mancha verde oliva que inicia del borde de la lámina y se extiende hacia adentro.

La gran variedad de síntomas reportados en la literatura necesitan ser aclarados y definidos para poblaciones particulares, con el fin de evitar confusiones y aportar a la unificación de nombres empleados para describirlos (Abang *et al.*, 2003).

## 2.5 Identificación y caracterización de *C. gloeosporioides*

Contar con la información concerniente a la correcta identidad de un patógeno, la descripción de sus rasgos característicos, la diversidad y distribución geográfica de sus poblaciones, etc., es un prerequisite para evaluar eficientemente medidas de prevención y control de enfermedades, garantizando una acción duradera.

El esquema tradicional de clasificación fúngica se basa en el reconocimiento de rasgos morfológicos definidos para un género y sus especies. La fuerte influencia que el medio ambiente ejerce sobre la estabilidad de los perfiles fenotípicos, su bajo nivel de polimorfismo y su carácter subjetivo por ser dependiente de la interpretación del observador, causa que su uso muchas veces no conduzca a una completa y correcta identificación principalmente a nivel de especies, siendo mucho más difícil que permitan una discriminación exitosa de subpoblaciones dentro de estas. Las técnicas en biología molecular responden a la búsqueda de un mejor y correcto entendimiento de la sistemática en hongos, ya que por estar basadas en rasgos genotípicos, excluyen de su análisis las limitantes propias de los métodos tradicionales (Freeman *et al.*, 1996; Freeman & Katan, 1997; O'Donnell *et al.*, 1998; Abang *et al.*, 2003; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Photita *et al.*, 2005; Azoifeifa-Delgado, 2006; Padder *et al.*, 2007; Than *et al.*, 2008). Sin embargo, las metodologías tradicionales y moleculares deben considerarse complementarias y no excluyentes para la exitosa, rápida y completa identificación y caracterización de microorganismos.

Protocolos basados en características fenotípicas han sido efectivos y de fácil adquisición para la diferenciación de determinadas especies del género *Colletotrichum*, un buen ejemplo son las pruebas de tolerancia al fungicida benomil y la prueba de presencia de proteasas en medio de hidrólisis de caseína, para diferenciar *C. gloeosporioides* de *C. acutatum*, siendo este último positivo para ambos ensayos (Martín & García-Figueroa, 1999; Abang *et al.*, 2003; Talhinhos *et al.*, 2005). Métodos enzimáticos también han sido desarrollados para el diagnóstico de antracnosis mediante ensayos de ELISA indirecta, basados en anticuerpos policlonales dirigidos al reconocimiento de los conidios de *C. gloeosporioides*, esta alternativa permitió el monitoreo de brotes de la enfermedad en soya (Soo *et al.*, 2004).

En el cultivo de ñame otras aproximaciones como: i) la compatibilidad vegetativa, cuyo propósito es medir la capacidad de los aislados para intercambiar material genético por

medio de anastomosis hifal, ii) el nivel de virulencia del patógeno *in vitro* sobre hojas sueltas y iii) la producción de metabolitos secundarios; han permitido además de identificar poblaciones de *C. gloeosporioides*, establecer relaciones entre las mismas. Estas estrategias sumadas a la descripción morfológica llevaron a la caracterización de aislados de *C. gloeosporioides* en cultivos de ñame nigerianos y a la identificación de las cuatro formas descritas en el numeral 2.1 (Abang *et al.*, 2002; Abang *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2004; Abang *et al.*, 2009).

La aplicación de técnicas moleculares para la detección de patógenos ha aclarado muchas confusiones que se tenían con respecto a la clasificación de especies y subespecies de diferentes géneros fúngicos. Los estudios se han concentrado en dos partes del genoma, mitocondrial (ADNm) y ribosomal (ADNr), ambas presentes en múltiples copias dentro de la célula. La unidad del ADN ribosomal (ADNr) es la más ampliamente empleada, esta se compone de tres genes codificantes para la unidad ribosomal 18S, 28S y 5.8S con secuencias conservadas comunes a todos los hongos, espacios intergénicos (IGS –Intergenic Spacer) y espaciadores internos transcritos (ITS -Internal Transcribed Spacer-) no codificantes y variables entre especies (Freeman *et al.*, 1996; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Freeman & Katan, 1997; Lee *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2004). Otras secuencias de genes como  $\beta$ -tubulina, Factor de Elongación 1 alpha (EF-1 $\alpha$ ), actina, calmodulina, quitina sintasa, gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa, glutamina sintetasa y manganeso superóxido dismutasa también han sido utilizadas tanto para diagnóstico como para resolver relaciones filogenéticas entre poblaciones (Talhinhas *et al.*, 2005; Cannon *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012; Pinzón-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Adicionalmente con el objetivo de determinar la complejidad genética de los aislados de *C. gloeosporioides* que infectan diversos cultivares, varias aproximaciones basadas en marcadores moleculares han sido empleadas para estimar diversidad poblacional, flujo de genes entre hospederos o áreas geográficas y para definir huellas genéticas de razas dentro de poblaciones patogénicas (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Than *et al.*, 2008). Los marcadores moleculares hacen referencia a segmentos de ADN que se comportan como puntos de referencia para el análisis del genoma, usualmente representan variantes o sitios polimórficos y además de las aplicaciones ya mencionadas han sido de gran provecho para estudios de mapeo y mejoramiento genético (Azofeifa-Delgado, 2006; Khoo *et al.*, 2011).

Problemas de sistemática en poblaciones de *Colletotrichum* spp. y subpoblaciones dentro de especies aisladas de ñame, olivo, aguacate, almendra, fresa, mango, papaya, tomate de árbol, maracuyá, guanábana y anémona; han sido resueltos gracias al uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores arbitrarios (ap-PCR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de la región ITS1-5.8S-ITS2 (ITS-RFLP), corte con enzimas de restricción, amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), amplificación al azar de microsatélites (RAMs), patrones de ADN ricos en adenina y timina generados por digestión de *HaeIII* asociados con el genoma mitocondrial (A+T-rich-DNA) y electroforesis con gradiente de denaturación (DGGE) para la separación de amplicmeros del gen 18S del ADNr (Freeman & Rodríguez, 1995; Freeman *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000; Abang *et al.*, 2002; Abang *et al.*, 2003; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2005; Photita *et al.*, 2005; Talhinhas *et al.*, 2005).

Dos de las técnicas ya mencionadas, ap-PCR y RAPD, junto con la amplificación de huellas del genoma (DAF), conforman las técnicas basadas en perfiles de múltiples amplicones arbitrarios o MAAP (*multiple arbitrary amplicon profiling*), las cuales se destacan por su fácil ejecución y porque no requieren de previo conocimiento del genoma. Los MAAP se fundamentan en el uso de uno o más cebadores arbitrarios dirigidos a un blanco específico pero a sitios desconocidos en el genoma y difieren entre sí, por parámetros como el tamaño de los cebadores, las condiciones de amplificación, los productos a obtener, la metodología para su visualización y la resolución de la técnica (Caetano-Anolles, 1993; Than *et al.*, 2008; Khoo *et al.*, 2011). Este último parámetro según Valadez & Kahl (2000), favorece a las técnicas DAF y ap-PCR con alta resolución sobre la técnica RAPD, considerada de baja resolución debido a que genera perfiles con menor cantidad de bandas.

El método ap-PCR fue desarrollado por Welsh y McClelland en 1990 para evaluar muestras de cinco especies de *Staphylococcus*. Emplea secuencias cortas de 10-16 nucleótidos derivadas de microsatélites, es decir, conformadas por elementos repetitivos que inician la síntesis aleatoria *in vitro* de fragmentos de ADN de longitud variable (Khoo *et al.*, 2011). Este método fue por primera vez empleado en el género *Colletotrichum* spp. por Freeman y Rodríguez (1995) para determinar su diversidad genética intra e interespecífica, permitiendo la identificación y clasificación de *C. acutatum*, *C. fragariae* y dos genotipos de *C. gloeosporioides* como los responsables de la antracnosis en fresa. En el 2005 Talhinhos y colaboradores retomaron el uso de ap-PCR en conjunto con otras metodologías para develar la limitada ocurrencia de *C. gloeosporioides* en olivo. En Colombia se ha demostrado la presencia de un población heterogénea de *C. gloeosporioides* en mango y maracuyá afectados por la antracnosis con ap-PCR, RAPD y A+T-rich (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003).

La técnica DAF fue propuesta por Caetano-Anollés y cols en 1991 y se caracteriza por el uso de cebadores cortos (5 y 8 pb). Fue empleada por primera vez en hongos para la estimación de variabilidad genética de aislados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) patógeno de la banana, permitiendo agrupar en dos la población en estudio (Bentley & Bassam, 1996).

## 2.6 Control

El control de la antracnosis abarca el uso de semillas sanas, rotación de cultivos, poda y quema de material contaminado, aspersiones con fungicidas (benomyl, manzeb, mancozeb, clorotalonil, captafol y folpet), biocontrol y uso de variedades resistentes; la elección de las estrategias a implementar depende en gran medida de su disponibilidad (Abang *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Aduramigba-Modupe *et al.*, 2008).

La alternativa más popular, accesible y de rápida acción es el manejo químico, infortunadamente la severidad de esta enfermedad ha conllevado a su uso excesivo, logrando en principio una disminución notoria de los inóculos del patógeno, pero no otorgando en la mayoría de los casos un control radical, por el contrario, el uso indiscriminado de fungicidas aumenta costos y riesgos como la contaminación ambiental y la adquisición de resistencia por parte del patógeno (Abang *et al.*, 2003; Pérez-Castro *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Aduramigba-Modupe *et al.*, 2008).



Alternativas de manejo eficientes y amigables con el medio ambiente como el control biológico requieren estudios que permitan el entendimiento de las interacciones entre los microorganismos involucrados y su entorno, para garantizar una dinámica a favor del cultivo. La literatura reporta los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Brevundimonas*, *Candida*, *Pestalotiopsis* con efecto positivo para el control de *C. gloeosporioides* en diferentes cultivos (Sharma *et al.*, 2009). Por otro lado, el conocimiento y exploración de la biología de *C. gloeosporioides* y la naturaleza genética involucrada en su interacción compatible con el cultivo de ñame, puede abrir el camino a la búsqueda de nuevas y efectivas herramientas de control. Un buen ejemplo son los genes reportados como posibles blanco de control por estar involucrados en la patogenicidad del hongo (Hwang *et al.*, 1995; Stephenson *et al.*, 2000; Yakoby *et al.*, 2001) o los ensayos realizados por Yakoby y cols (2000) que sugirieron el efecto del pH en la regulación de la secreción de pectín liasas, enzimas degradadoras de la pared celular vegetal.

Entre las estrategias más prometedoras para el control de la antracnosis está la selección de variedades resistentes (Amusa *et al.*, 2003). A Colombia fueron traídas variedades resistentes a la antracnosis del Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) ubicado en Ibadan, Nigeria, las cuales están siendo evaluadas en las zonas de Montes de María, Sabanas y Zona Costanera de Córdoba (Pérez-Martínez & Clavijo-Ponce, 2012). Su correcta valoración debe incluir pruebas con los aislados más virulentos de *C. gloeosporioides* encontrados en la zonas a introducir, para garantizar la eficiencia de la medida de control.

El conocimiento de la estructura poblacional del patógeno, la naturaleza de su variación y la distribución de sus miembros más virulentos; es necesario no solo para la incursión de medidas eficientes, sostenibles y duraderas para el control de la antracnosis como la mencionada selección de variedades resistentes, también para el diseño de nuevas alternativas y la adopción de medidas preventivas (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003).



## **3. Materiales y Métodos**

### **3.1 Muestras**

El material vegetal del que se obtuvieron los aislamientos fúngicos correspondió a hojas de ñame variedad criollo (*D. alata*) y espino (*D. rotundata*) con lesiones necróticas y manchas a nivel foliar, síntomas estos asociados a la antracnosis. El material fue recolectado por miembros del grupo de Investigación sobre el Cultivo de Ñame del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, en 5 fincas ubicadas en los municipios de San Jacinto, Bolívar; Chinú, Córdoba; Toluviejo, Los palmitos y Sampedra, Sucre.

### **3.2 Aislamiento de *C. gloeosporioides***

De las muestras con síntomas de antracnosis se cortaron fragmentos de los límites de la lesión que comprendían tanto tejido necrótico como tejido sano, estos fueron tratados con solución de hipoclorito de sodio al 5,25% por espacio de 1 min y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. A continuación, se secaron los cortes con papel absorbente estéril y se llevaron directamente a cajas de petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA, OXOID LTD.) más 50 ppm de cloranfenicol, finalmente las cajas fueron incubadas durante 8 días a 24°C, en fotoperiodo 16 h luz. Las colonias con características macroscópicas propias del género *Colletotrichum* spp. según las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) y la base de datos Mycobank, fueron purificadas realizando cultivos monospóricos como indica Saldarriaga-Cardona y cols (2008). Los aislados fueron conservados por el método de criopreservación y cultivo periódico con aceite mineral según Pinzón-Gutiérrez y cols (2009).

### **3.3 Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo utilizado por Pinzón-Gutiérrez y cols (2013). La calidad de la extracción fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. La cuantificación del ADN se realizó con el fluorómetro Qubit (Invitrogen®) y las concentraciones se ajustaron a 10 ng/μl por dilución con agua ultra pura.

### 3.4 Amplificación y secuenciación de Espaciadores Internos Transcriptos (ITS)

Para la amplificación de los ITS se usaron los cebadores universales ITS1 e ITS4 reportados por White en 1990, los cuales flanquean la región que comprende los espaciadores 1, 2 y el gen ribosomal 5.8S. Las concentraciones finales de los reactivos para la amplificación fueron las siguientes: buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, cebadores 0,3 µM, una unidad de Taq Polimerasa (Bioline®) y 40 ng/µl de ADN muestra en un volumen final de 20 µl. Se incluyó un control negativo donde la reacción no contenía muestra de ADN. La programación del termociclador (C1000™ de BIO-RAD) correspondió a un ciclo inicial de 2 min a 95°C, 34 ciclos de amplificación (desnaturalización por 1 min a 95°C, anillamiento por 30 s a 50°C y extensión por 2 min a 72°C) y un ciclo de extensión por 10 min a 72°C. Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en buffer TBE 1X, teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen).

Los amplímeros obtenidos fueron purificados con solución Sure Clean Plus (Bioline®) acorde con las instrucciones de manufacturación y fueron enviados a MacroGen® Korea, para su secuenciación en ABI 3700, secuenciador automático. Las secuencias fueron comparadas con la herramienta BLAST contra la base de datos “nucleotide collection (nr/nt)” del GenBank, aquellas identificadas por similitud como pertenecientes a la especie *C. gloeosporioides* fueron editadas con el programa BioEdit y alineadas con la aplicación ClustalW. El alineamiento fue usado para inferir árboles de parsimonia con los programas Winclada y Nona (Felsenstein, 1985) a partir de opciones de búsqueda heurística. El soporte de la topología interna del dendrograma fue evaluado mediante análisis de Bootstrap con 1000 permutaciones.

### 3.5 Descripción de rasgos morfológicos

Con los aislados identificados como *C. gloeosporioides* se conformó la colección de la especie aislada de síntomas de antracnosis en ñame. Se realizaron pases por triplicado de los aislados a medios PDA y estos fueron incubados a 25°C con fotoperiodo de 16 h luz. La tasa de crecimiento de la colonia se calculó promediando la medición diaria de crecimiento (mm por día) durante ocho días, transcurrido este periodo se registró la presencia de acérvulos y el color de la colonia según el modelo RGB (*Red, Green, Blue* por sus siglas en inglés), basado en la representación del color por su composición en términos de colores primarios, en el programa Adobe Photoshop Elements 2.0. Para la evaluación microscópica de tamaño y forma de los conidios se realizaron microcultivos por triplicado para cada aislado como indica Pinzón-Gutiérrez y cols en 2009. Tras 15 días de incubación se valoraron 10 conidios al azar por microcultivo en microscopio de contraste de fases Nikon eclipse E600.

Los datos morfológicos obtenidos para la colección, fueron recopilados en una matriz construida con las medias o medianas de las réplicas realizadas a cada aislado en cada una de las variables evaluadas. El análisis de los datos se realizó convirtiendo la matriz de variables morfológicas en matriz de similitud y consecutivamente en matriz de distancia mediante el coeficiente de Gower en el programa estadístico “R”. Los resultados fueron representados a través de un dendrograma elaborado con el método de unión media aritmética no ponderada (UPGMA) en el mismo programa.

### 3.6 Evaluación de Marcadores Moleculares

#### ▪ ap-PCR

Para la amplificación se utilizaron los cebadores GACA<sub>4</sub>, CAG<sub>5</sub> y AGG<sub>5</sub>, derivados de minisatélites. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20 µl que contenía 20 ng/µl de ADN genómico, Buffer 1X, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, una unidad de Taq Polimerasa (Bioline®) y 1 µM del iniciador. Se incluyó un control negativo en la reacción para cada iniciador, al cual no se le agregó muestra de ADN. El programa de amplificación correspondió a una incubación inicial de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos con una denaturación de 30 s a 95°C, anillamiento a 50°C por 30 s y extensión a 72°C durante 1 min y medio (Freeman & Rodríguez, 1995; Freeman & Katan, 1997; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003).

#### ▪ DAF

Se emplearon 8 iniciadores OPM (Tabla 3-1), las concentraciones de los componentes de la reacción correspondieron a 0,5 ng/µl de ADN genómico, 0,25 mM de dNTPs, 5,3 µM del cebador, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X del buffer de la enzima y 0,4 unidades de Taq Polimerasa (Biolase™), para un volumen final de 20 µl. Se incluyó un control negativo en la reacción para cada iniciador, al cual no se le agregó muestra de ADN. Las condiciones en el termociclador fueron las siguiente: denaturación inicial a 94°C por 5 min, 40 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 15 s, hibridación a 35°C por 20 s y extensión a 72°C por 1 min, finalmente una extensión por 5 min a 72°C (Cuellar, 2009).

**Tabla 3-1:** Secuencias de iniciadores DAF empleados para la obtención de huellas genéticas de la colección.

Iniciadores	Secuencia 5' → 3'
OPM-01	GTTGGTGGCT
OPM-02	ACAACGCCTC
OPM-03	GGGGGATGAG
OPM-04	GGCGGTTGTC
OPM-06	CTGGGCAACT
OPM-07	CCGTGACTCA
OPM-09	GTCTTGCGGA
OPM-10	TCTGGCGCAC

Para las dos técnicas se utilizó un termociclador C1000™ de BIO-RAD®, los productos de amplificación fueron visualizados en el sistema de electroforesis por microchip MultiNA (Shimadzu®). Para el análisis se construyó en Excel (Microsoft Office) una matriz binaria de doble estado con los patrones de bandeo obtenidos, la cual fue convertida en matriz de distancias mediante el coeficiente de similitud de Dice y consecutivamente en matriz de agrupamiento con el método UPGMA. Todos los análisis se ejecutaron con el paquete estadístico NTSYS-PC versión 2.02.

La diversidad genética promedio ( $H_e$ ) (Nei, 1978) definida como la probabilidad de que en un locus único, cualquier par de alelos escogidos al azar, sean diferentes entre sí; fue calculada para cada locus  $j$  con 2 alelos (presencia y ausencia), mediante la fórmula  $h_j = 1 - p^2 - q^2$  siendo  $p$  y  $q$  las frecuencias alélicas. Finalmente el promedio de todos los loci fue estimado con la fórmula  $H = \sum h_j / L$ , donde  $L$  fue el número total de loci.

## 3.7 Asociación entre características morfológicas y moleculares

Se compararon los agrupamientos obtenidos a partir de caracteres morfológicos, huellas genéticas y secuencias ITS, con el objetivo de identificar similitudes. Para establecer relaciones entre aislamientos de *C. gloeosporioides* se empleó un análisis multivariado, adicionalmente se proyectaron variables ilustrativas o suplementarias en función de la ubicación geográfica y especie de ñame de la que se aisló el hongo, para evaluar si la agrupación de los aislamientos según las características evaluadas guardaba cierta dependencia con dichas variables.

Para este análisis se construyó una matriz resumen indicando el grupo al que correspondió cada uno de los aislados en cada uno de los dendogramas obtenidos: caracterización morfológica, perfiles moleculares obtenidos a partir de las técnicas ap-PCR y DAF y secuencias ITS. Por la naturaleza categórica de la matriz se empleó un análisis de correspondencia múltiple (ACM) ejecutado en el programa "R".

## 3.8 Establecimiento de una escala de virulencia

### 3.8.1 Propagación y aclimatación de *D. rotundata*

Los ensayos de propagación se realizaron a partir de yemas axilares con tejido meristemático y primordios foliares de plántulas de ñame variedad espino (*D. rotundata*), susceptibles a la antracnosis, provenientes de la Costa Caribe Colombiana Banco de Germoplasma del ICA Corpoica Turipana y multiplicadas en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). Los explantes seleccionados fueron sembrados en frascos de vidrio que contenían 20 ml de medio MS (Murashige & Skoog, 1962) enriquecido con vitaminas Morel (Pantetonato de Calcio, Ácido nicotínico, Piridoxina, Biotina, Tiamina y Mioinositol) (Morel & Wetmore, 1951), Ácido fólico y L-asparagina. El pH fue ajustado a 5,8 y en seguida fueron incorporados 30 g de sacarosa como fuente de carbono y como agente gelificante 5 g de agar. Una vez servidos los medios en frasco de vidrio de 250 ml, fueron esterilizados a 20 libras de presión y 121°C por 15 min. La multiplicación del material se realizó bajo condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar. Los propágulos se incubaron a 25°C, con humedad relativa del 80%, bajo luz blanca fluorescente con fotoperiodo de 16 h luz.

Transcurridas siete semanas se inició el proceso de aclimatación de las plántulas a condiciones de invernadero con la siembra del material proveniente de cultivo *in vitro* en el sustrato (Chacón, 2005). Este fue preparado cinco días antes de la siembra para permitir la incorporación de sus componentes: 200 g de sustrato de cultivo Berger BM2 (Turba de esfagno canadiense -70%- perlita, vermiculita), 100 g de arena, 5 g de triple 15 y suficiente agua (Proporción usada por matera número 10). Otro procedimiento previo a la siembra consistió en el traslado un día antes de las plántulas propagadas *in vitro* a invernadero, como primera fase de aclimatación.

Para la siembra las plántulas fueron lavadas a nivel radicular con hipoclorito de sodio al 0,2% con el fin de eliminar restos de medio, luego se transfirieron a las materas que contenían 300 g del sustrato. Las plántulas fueron cubiertas con un vaso plástico

transparente para conservar la humedad y temperatura. Pasados ocho días se hizo un agujero a los vasos, a los 15 días aberturas a cada lado y para finalizar el cambio gradual de la condiciones se quitaron los vasos a los 20 días. La fertilización se realizó con 20 ml de solución Nutri-ponic (Walco S. A.®) por materia, cada 15 días. A las plántulas en crecimiento se les fueron controladas las condiciones ambientales en un rango de temperatura entre 20 y 27°C y de humedad entre 80 y 95%, usando un calentador y dos ollas de agua hirviendo. El riego se hizo dos veces por semana en horas de la tarde.

### 3.8.2 Preparación del inóculo infectivo

Para infectar las plántulas de ñame se seleccionó al azar un aislado, del cual se generaron repiques que se incubaron por 15 días bajo las mismas condiciones ajustadas para las plántulas. El inóculo consistió en una suspensión conidial de estos repiques a una concentración  $1 \times 10^5$  conidias/ml en una solución de tween 80 al 0,05%.

### 3.8.3 Prueba de patogenicidad

Para corroborar la patogenicidad del aislado escogido al azar, se realizó una prueba de patogenicidad previa a los ensayos de virulencia con cuatro plántulas de ñame de tres meses de edad. La infección se realizó por aspersión en los foliolos de 2 ml de suspensión conidial con aerógrafo y compresor de aire (Paasche®). Paralelamente, se asperjó un medio PDA para control de la viabilidad de la suspensión conidial. Como testigo una repetición de la prueba fue asperjada con solución tween libre de conidios. Las plantas fueron inoculadas a las 17:00 h para evitar la desecación (Benítez-Camilo *et al.*, 2003). Las condiciones ambientales fueron controladas durante toda la prueba como se indica en el ítem 3.8.2 y el progreso de la infección fue monitoreado diariamente

### 3.8.4 Ensayos de virulencia

Se construyó bajo invernadero una estructura en plástico calibre 4 dividida en seis cámaras de aproximadamente 40 cm<sup>2</sup> por 80 cm de altura cada una. En cada cámara se dispuso un ensayo que constaba de cuatro plántulas de ñame de tres meses de edad. Para la infección se efectuó el mismo procedimiento, control de viabilidad y condiciones ambientales empleados para la prueba de patogenicidad, en cinco de los ensayos ubicados en las cámaras para un total de 20 plántulas infectadas. Como testigo el sexto ensayo fue asperjado con solución tween libre de conidios.

Transcurridos dos meses, las hojas de ñame afectadas fueron escindidas de la planta y escaneadas a máxima resolución, para su posterior uso en el programa ImageJ, empleado para calcular el área foliar afectada por el aislamiento de *C. gloeosporioides*. En un diseño completamente aleatorizado el total de datos fueron tratados con análisis de varianza.

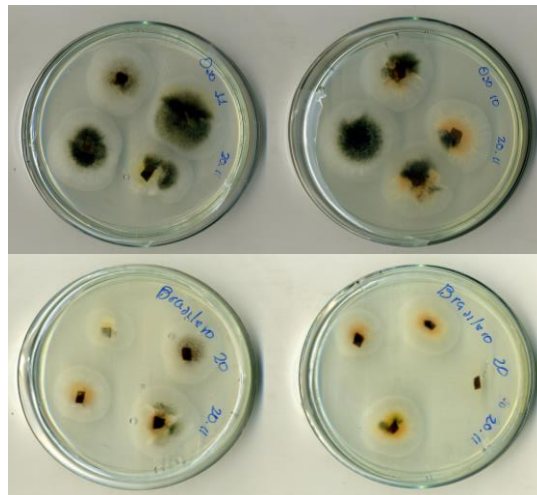
El patógeno fue aislado nuevamente de los foliolos sintomáticos, con el objetivo de corroborar su responsabilidad en la presencia de los mismos (Postulados de Koch).



## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Identificación del agente causal y síntomas de la antracnosis en ñame

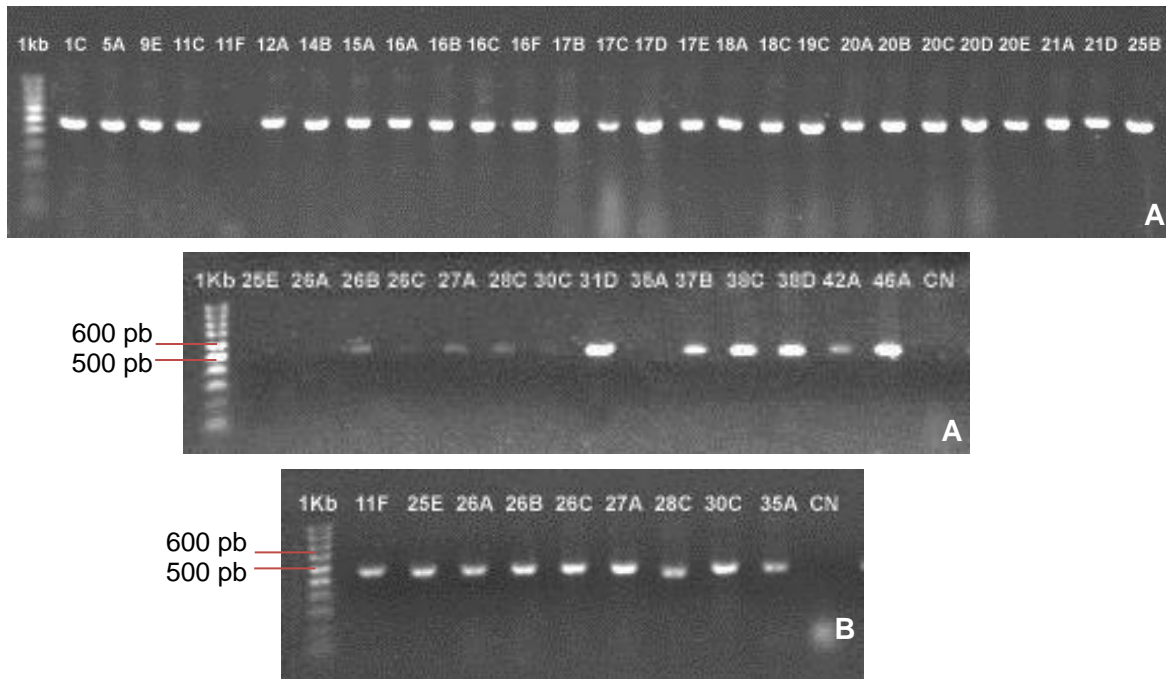
El aislamiento de patógenos fúngicos a partir de hojas de ñame con diferentes afecciones asociadas a antracnosis, resultó en la identificación por reconocimiento de rasgos macro y microscópicos de los siguientes géneros: *Colletotrichum* con 41 aislamientos, *Fusarium* con 10, *Curvularia* con 3, *Phomopsis* con 2 y *Pestalotia* con 1. El hallazgo de un 72% de aislamientos de *Colletotrichum* en las lesiones reportadas, permitió sugerir la responsabilidad de este género fúngico en el desarrollo de los síntomas asociados a antracnosis en ñame (Figura 4-1). A nivel de especie no se logró una clara identificación, por lo que se recurrió a estrategias moleculares para confirmar la presencia de *C. gloeosporioides*, especie reportada como agente causal de antracnosis en ñame (Abang *et al.*, 2002; Abang *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Cerón-Rincón *et al.*, 2006), y adicionalmente para determinar la posible participación de otras especies en el desarrollo de la enfermedad.



**Figura 4-1:** Aislamientos fúngicos obtenidos a partir de tejido vegetal con síntomas de antracnosis.

Para la identificación molecular se obtuvieron cantidades variables pero apropiadas de ADN que oscilaron entre 12,2 y 709 ng/μL. La amplificación con iniciadores universales para ITS y la posterior visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa, mostró fragmentos entre 550 y 580 pb (Figura 4-2). Resultados

similares fueron obtenidos por Álvarez y cols (2004) en sus estudios de caracterización de *C. gloeosporioides* aislado de antracnosis en guanábana.



**Figura 4-2:** **A.** Amplificación de aislados del género *Colletotrichum* asociados al cultivo de ñame con iniciadores ITS universales. **B.** Repetición muestras no amplificadas. **Marcador de peso molecular:** HyperLadder™ IV. **CN:** Control Negativo.

Los resultados obtenidos por secuenciación de los amplímeros (Anexo A) y su comparación con la información de la base de datos “nucleotide collection (nr/nt)” del GenBank, permitieron la identificación de un aislado de la especie *C. capsici* y 40 aislados de la especie *C. gloeosporioides*, de los últimos ocho compartieron máximo de similaridad con la especie *C. alatae* y once con *C. cliviae* (Anexo B).

El primer reporte de *C. capsici* en ñame fue publicado por Twumasi en 1986 en cultivares de *Dioscorea alata* L. ubicados en Ghana. La especie se aisló de tallos, peciolo y hojas de ñame con manchas de asfalto, sin embargo su responsabilidad en la sintomatología observada no fue comprobada. Al 2013 Mehetre también reportó antracnosis en cultivos de ñame en la India causada por *C. capsici*, en su estudio de evaluación del efecto de varias fuentes de nitrógeno y antagonistas sobre esta especie.

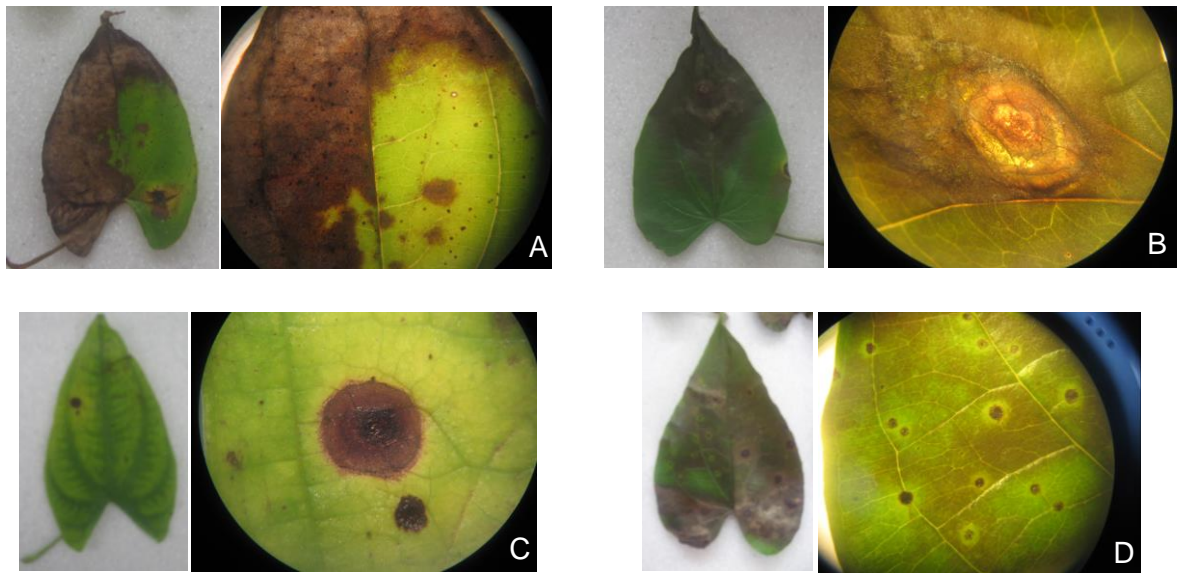
En cuanto a las especies coincidentes en valores de similaridad con *C. gloeosporioides* para algunos aislados fueron anotadas recientemente. *C. alatae* fue descrita en el 2012 por Weir y cols, a partir de holotipos originarios de la India, se consideró por análisis de filogenia multigenes un taxón perteneciente al complejo *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*, su nombre hace referencia a su hospedero *Dioscorea alata* y etimológicamente se deriva del nombre hoy invalido *C. gloeosporioides* “f. *alatae*”. Con respecto a la secuencia de la especie *C. cliviae* con la que se encontró similaridad, fue anotada apenas en julio del 2013 como hongo endófito de *Salvia miltiorrhiza* en China. Las primeras accesiones de esta especie fueron reportadas en el 2009, etimológicamente denominadas por su hospedero *Clivia miniata* (Hyde *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009); también se conocen estudios filogenéticos multilocus realizados por Cannon



y cols (2012), en los que la especie posiblemente constituye un linaje monofilético hermano de los clados bien diferenciados *C. acutatum*, *C. graminicola*, *C. spaethianum*, *C. destructivum*, *C. dematium*, *C. gloeosporioides*, *C. boninense* y *C. truncatum*.

Cabe resaltar que en este trabajo fue posible aislar las especies fúngicas mencionadas a partir de cuatro diferentes lesiones foliares, presentes indistintamente en las dos especies afectadas, *D. alata* y *D. rotundata*.

- **Lesión 1:** Parches irregulares coalescentes que formaban una mancha marrón que se extendía hasta el borde de la lámina foliar (Figura 4-3A). Este síntoma fue similar a los descritos en ñame por Ayodele y cols (2004) como tizón tipo 2 y por Abang y cols (2003) como uno de los dos síntomas observados en sus ensayos bajo condiciones controladas. Adicionalmente, fue observado el patrón de restricción de la extensión de la lesión por las venas de las hojas, reportado por el último autor mencionado.
- **Lesión 2:** Mancha marrón oscura que se extendió hacia el ápice, en el centro se observó un punto necrótico irregular y alargado con anillos concéntricos color marrón claro y amarillo. En este caso no hubo semejanza clara con ningún tipo de síntoma reportado para antracnosis en ñame (Figura 4-3B).
- **Lesión 3:** Punto necrótico regular color marrón con centro más oscuro (Figura 4-3C). Este mismo síntoma fue reportado por Ayodele y cols en el 2004, como punto necrótico tipo 7.
- **Lesión 4:** Varios puntos necróticos color marrón con halo clorótico (Figura 4-3D). Estos se asemejaron a los puntos necróticos tipo 4 identificados por Ayodele y cols (2004) y a uno de los síntomas reconocidos por Abang y cols (2003) en sus ensayos bajo condiciones controladas.



**Figura 4-3:** Síntomas asociados a antracnosis en ñame en cultivos de la Costa Caribe colombiana. **A.** Lesión 1, **B.** Lesión 2, **C.** Lesión 3 y **D.** Lesión 4.

Evidencias muestran la asociación de diferentes especies de *Colletotrichum* con la ocurrencia de antracnosis en un mismo hospedero (Than *et al.*, 2008). Dicha premisa junto a los resultados obtenidos en este estudio sugieren la presencia de un complejo *C. gloeosporioides sensu lato* y otras especies del género *Colletotrichum*, involucradas en el desarrollo de la antracnosis en cultivos de ñame colombianos.

## 4.2 Caracterización morfológica y molecular

Con los 40 aislados identificados como *C. gloeosporioides* se conformó la colección de la especie asociada a antracnosis en ñame, sometida en este trabajo a una primera etapa de caracterización. La matriz construida con datos morfológicos de la colección de hongos fue de tipo mixto formada por tres tipos de variables (Anexo C):

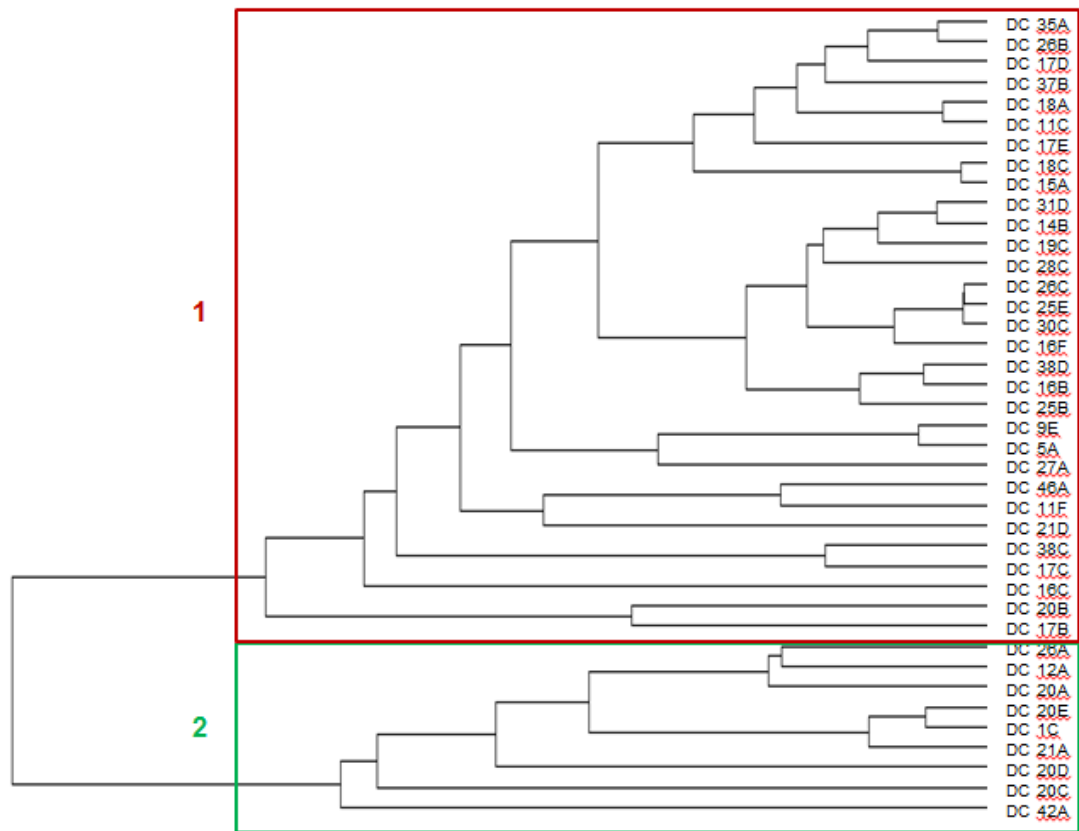
- **Variables continuas:** tasa de crecimiento micelial, largo de los conidios y ancho de los conidios.
- **Variables categóricas:** color de la colonia y forma de los conidios (Tabla 4-1).
- **Variable binaria:** presencia de acérvulos.

Morfológicamente la colección fue heterogénea, incluso en un mismo aislamiento se pudieron observar diferentes variantes para una característica, este fue el caso de la variable forma de los conidios que como se muestra en la Tabla 4-1, requirió conforme a las observaciones, la asignación de categorías con más de un rasgo.

**Tabla 4-1:** Descripción de categorías para las variables color de la colonia y forma de los conidios, empleadas para la caracterización de la colección (Anexo D y E).

Categoría	Color de la colonia	Forma de los conidios
1	Centro salmón, halo gris oliva, borde salmón amarillento y/o beige oliva	Cilíndricos, lados rectos, extremos redondos
2	Salmón amarillento con parches oscuros	Curvas fusiformes
3	Naranja con masas conidiales en anillos concéntricos	Categoría 1 y Cilíndricos, lados rectos, un extremos redondo y otro fusiforme
4	Beige oliva u oliva amarillento; parches, figuras o anillos grises	Categoría 2 y fusiformes
5	Oliva, gris oliva a negro oliva, anillos concéntricos	Categoría 3 y con lados irregulares

Los resultados expuestos a partir del tratamiento de los datos con el coeficiente de similitud y distancias de Gower y la respectiva representación de la agrupación de los aislados por el método UPGMA, permitió discriminar dos morfotipos (Figura 4-4). Este método permitió un análisis apropiado de la matriz con variables de diferente naturaleza, generada en este estudio. Correa-Londoño y cols en el 2007, reportaron su empleo este junto con otros métodos multivariantes para la agrupación de aislamientos de *Colletotrichum* spp. con base en características morfológicas y culturales, obteniendo resultados igualmente satisfactorios.



**Figura 4-4:** Dendrograma construido por el método UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Gower de las variables morfológicas evaluadas en la colección de *C. gloeosporioides* aislada de ñame.

Las descripciones particulares de los dos morfotipos identificados dentro de la colección de *C. gloeosporioides* aislada de ñame se muestran en la Tabla 4-2. De forma general se caracterizaron por:

**Morfotipo 1:** mostró alta variabilidad, la media para tasa de crecimiento y longitud de los conidios fue mayor que la observada para el morfotipo 2, fueron predominantes las colonias con tonalidades oliváceas y los conidios cilíndricos con lados rectos y extremos redondos, finalmente la mayoría de aislados presentaron acérvulos.

**Morfotipo 2:** grupo más homogéneo, todos los aislamientos presentaron conidios cilíndricos con lados rectos y ambos extremos redondos o uno de ellos fusiforme, ocho de los nueve aislamientos agrupados presentaron tonalidad salmón y la ausencia de acérvulos dominó este grupo con tan solo una excepción.

La variable tamaño de los conidios fue la más ambigua, su marcada variación no permitió por sí sola una clara diferenciación entre aislados, la variabilidad de este carácter también ha sido reportada por Olivera y cols (2005) en aislados de *C. gloeosporioides* en olivo.

**Tabla 4-2:** Características de los morfotipos discriminados mediante coeficiente de similitud de Gower

Variable		Morfotipo 1	Morfotipo 2
Crecimiento (mm/d)	Mín/Máx	9,8 – 16,6	9 – 13,4
	Media	13,92	10,7
Color colonia	Categorías	1, 2, 3, 4, 5 y 6	1 y 4
	Mediana	5	1
Acérvulos	Presencia/ausencia	0 y 1	0 y 1
	Mediana	1	0
Forma conidios	Categorías	1, 2, 3, y 4	1, 3 y 5
	Mediana	1	1 y 3
Largo (µm)	Mín/Máx	11,47 – 17,89	14,37 – 19,39
	Media	15,40	17,19
Ancho (µm)	Mín/Máx	2,6 – 5,5	2,69 – 4,56
	Media	4,41	3,58

La comparación con estudios realizados por Abang y cols (2002), quienes trabajaron con el mismo patosistema y reportaron cuatro formas para la especie *C. gloeosporioides* aislada de ñame en Nigeria, permitió establecer coincidencias entre la forma FGO y el **morfotipo 2** identificado en este estudio, con respecto a la coloración, tasa de crecimiento de la colonia y forma de los conidios. No fueron encontradas más correspondencias debido posiblemente a la adopción de diferentes criterios de agrupación, Abang y cols (2002) describieron formas del hongo en función de una única variable, la coloración de la colonia; mientras en este estudio se agruparon los aislados sopesando todas las variables evaluadas.

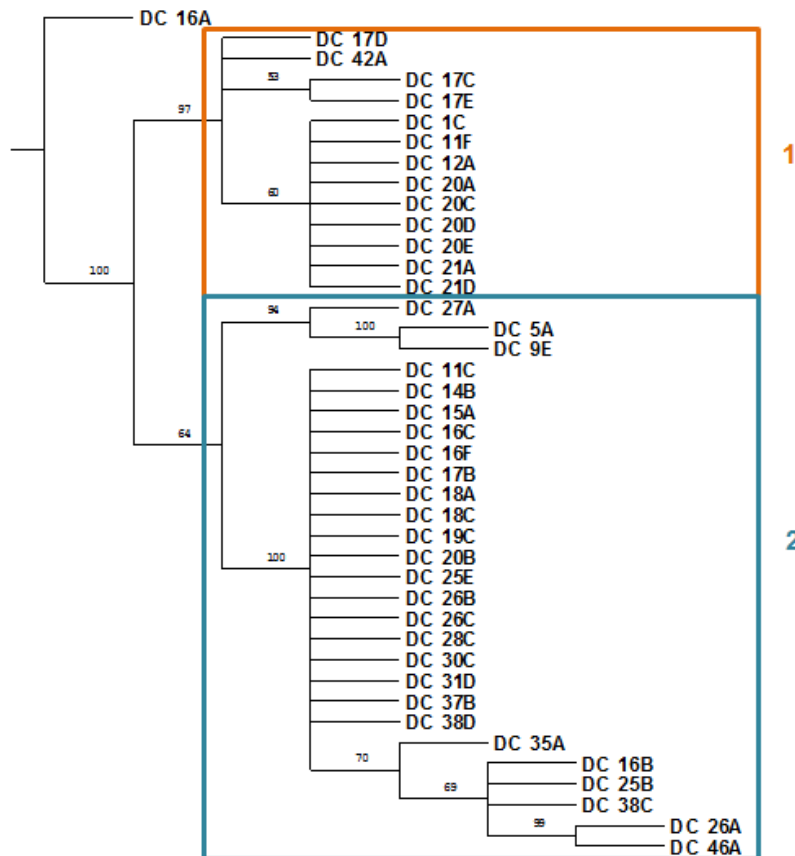
Cabe anotar que en comparación con estudios de caracterización de *C. gloeosporioides* aislado de otros hospederos, los aislados objeto de este estudio mostraron afinidad con las descripciones reportadas por Domínguez-Guerrero y cols (2012), para aislamientos provenientes de palma aceitera en el sur del Lago de Maracaibo en Venezuela. Particularmente, la descripción del **morfotipo 2** mostró afinidad con las descripciones anotadas para aislados provenientes de mango en Colombia (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003); de lima en la Florida, Estados Unidos (Brown *et al.*, 1996); y olivo en España (Martín & García-Figueres, 1999).

Por otro lado, los morfotipos identificados en este trabajo también presentaron correspondencia con dos grupos endófitos de *C. gloeosporioides* aislados de plantas sanas de banana (*Musa acuminata*), jengibre (*Alpinia malaccensis*) y *Eupatorium thymifolia* (Photita *et al.*, 2005). La similitud morfológica entre aislamientos de *C. gloeosporioides* provenientes de plantas sanas y los identificados en este estudio, abre un interrogante con respecto a la asociación existente entre cada miembro de una población catalogada como patógena con la enfermedad ocasionada. Evidencias como esta resaltan la importancia de abonar esfuerzos al conocimiento de los patosistema.

Los aislados forma SGG reportados por Abang y cols (2003) como altamente virulentos para *D. alata* y *D. rotundata*, únicos causantes de defoliación y muerte de las plantas inoculadas (Mignouna *et al.*, 2001), no fueron identificados en la colección caracterizada en este trabajo, soportando la afirmación realizada en 2003 por Abang y cols: “El tipo SGG, a nuestro conocimiento, no ha sido reportado en ninguna otra región productora de ñame en el mundo” (p.492).

Como complemento a la caracterización morfológica y acercamiento a inferencias más certeras, fueron empleadas técnicas basadas en el ADN. Las secuencias ITS empleadas para la identificación de la colección de *C. gloeosporioides* y la generación de huellas genéticas mediante las técnicas ap-PCR y DAF, permitieron caracterizar molecularmente la colección de este patógeno procedente de cultivos de ñame ubicados en la Costa Caribe colombiana.

Partiendo de la edición y alineamiento de las secuencias ITS (Anexo A), se agruparon los aislamientos empleando para el análisis el aislado de *C. capsici* como grupo externo. El árbol más parsimonioso obtenido separó claramente la colección en dos clados, con buen soporte bootstrap (Figura 4-5). Dichos hallazgos indican la heterogeneidad genética de la colección objeto de interés.



**Figura 4-5:** Árbol más parsimonioso obtenido por búsqueda heurística en el análisis de secuencias ITS de la colección de *C. gloeosporioides*. Los niveles de confianza bootstrap basados en 1000 remuestros son mostrados en las ramas.

En cuanto a las huellas genéticas generadas a partir de las metodologías ap-PCR y DAF mostraron patrones altamente polimórficos entre los aislados de la colección, con un total de 221 bandas con pesos moleculares entre 125 y 1.737 pb, garantizando un buen poder de discriminación (Anexo F). La agrupación de los aislados permitió identificar a un coeficiente de similitud de Dice de 0,35, tres grupos genéticos disímiles dentro de la especie (Figura 4-6). Los aislados DC 5A, DC 9E y DC 42A mostraron distancias de agrupación menores a 0,35, por tanto para este ensayo su relación fue más lejana que entre los demás miembros de la colección. El cálculo de la diversidad genética promedio

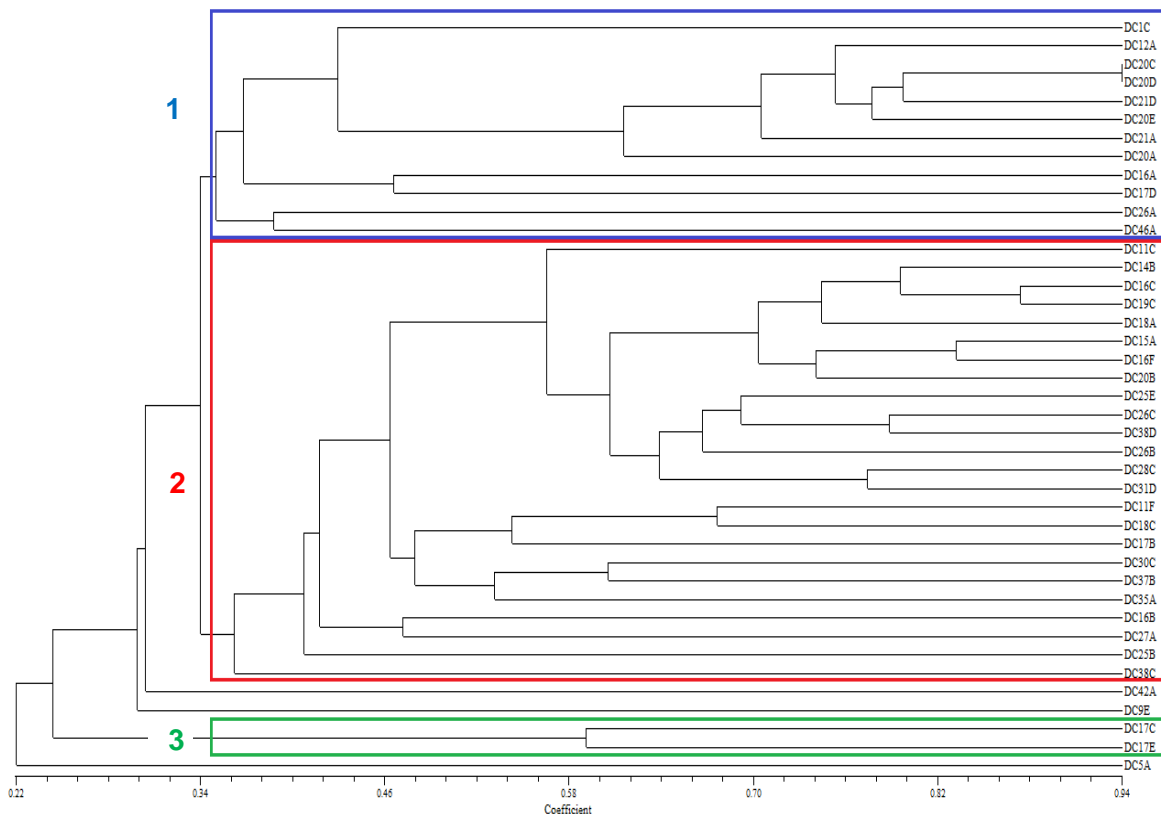
de todos los cebadores evaluados para la colección fue igual a 0,28, revelando de moderada a alta diversidad entre los aislados.

La similitud de las secuencias ITS contra bases de datos, los diferentes tipos de síntomas asociados a la antracnosis, los agrupamientos a nivel morfológico y molecular, el coeficiente de similitud de DICE y la estimación de la diversidad genética, indicaron la alta variabilidad dentro de la colección de *C. gloeosporioides* aislada de ñame procedente de diferentes zonas de la Costa Caribe colombiana. La alta variabilidad de esta especie tanto en ñame como en otros cultivos ha sido ampliamente reportada, evidenciada a partir de distintas metodologías.

En ñame la alta diversidad genotípica de *C. gloeosporioides* fue registrada en Nigeria por Abang y cols (2005), calculada a partir de las técnicas de amplificación de la subunidad 18S de ADNr visualizada en DGGE y MP-PCR, cuyos resultados permitieron estimar diversidad de 0,25 y 0,21 para las formas virulentas FGS y SGG, valores coincidentes con los obtenidos en este trabajo. En el año 2006, el mismo autor confirmó la alta diversidad del patógeno tanto en diferentes especies del género *Dioscorea*, como en hospederos que compartían la misma zona agroecológica con el cultivo de ñame.

La complejidad de esta especie en otros hospederos fue demostrada por parsimonia de secuencia ITS en aislados de plantas tropicales en Tailandia por Photita y cols en el 2005. La alta variabilidad de sus poblaciones también ha sido referida en fresa (Freeman & Rodríguez, 1995; Freeman & Katan, 1997), aguacate (Freeman *et al.*, 1996; Montero-Tavera *et al.*, 2010), papaya (Casarrubias-Carrillo *et al.*, 2003), guanábana (Álvarez *et al.*, 2004), mango (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Sanabria *et al.*, 2010) y lima Tahití (Sanabria *et al.*, 2010); estimada mediante datos obtenidos con las metodologías ap-PCR, RAPD, RAMs y A+T-rich DNA de forma independiente o combinada.

La variabilidad no solo se hace presente en la especie *C. gloeosporioides*, evaluaciones como las realizada por Padder y cols (2007) en poblaciones de *C. lindemuthianum* causante de antracnosis en frijol común a partir de RAPD, han mostrados índices de diversidad de 0,26 a 0,33. Así mismo, en la especie *C. acutatum* procedente de lima Tahití fueron detectadas poblaciones heterogéneas a partir de RAMs (Sanabria *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios de diversidad entre especies del género *Colletotrichum* han mostrado mayor grado de diversidad en la especie *C. gloeosporioides* en comparación con otras del género evaluadas (Freeman & Rodríguez, 1995; Sanabria *et al.*, 2010).



**Figura 4-6:** Dendrograma construido con huellas genéticas generadas con las técnicas ap-PCR y DAF de la colección de *Colletotrichum* spp. aislada de ñame, basado en análisis de agrupamiento (UPGMA) de una matriz de similaridad (Dice).

El principal riesgo que representa la alta variabilidad en la colección de *C. gloeosporioides* asociada a cultivos de ñame de zonas productoras en Colombia, está relacionado con el incremento de la adaptabilidad evolutiva del patógeno, tanto a nuevos ambientes como a nuevos hospederos (Abang *et al.*, 2006), lo que implica dirigir el conocimiento a soluciones que abarquen la variabilidad de la población.

Los resultados obtenidos en este estudio según la literatura pueden ser explicados por varios factores. Uno de los más representativos según Abang y cols (2003, 2004) y Montero-Tavera y cols (2010), es la recombinación heterotática entre aislados vegetativamente incompatibles ocurrida durante la reproducción sexual. Aunque no es común encontrar el teleomorfo (*G. cingulata*) en cultivo, existen evidencias de su presencia en hojas de ñame senescentes severamente infectadas en Ibadan e Idah, Nigeria (Abang *et al.*, 2006). Adicionalmente, es posible predecir su presencia según el razonamiento expuesto por Wastie en 1972 (citado por Abang y cols, 2006) que plantea el caso en que la infección fuera causada únicamente por conidias, como resultado las poblaciones exhibirían numerosos casos de presencia de genotipos idénticos y un alto nivel de diferenciación entre poblaciones separas geográficamente, debido a la limitada distancia de propagación de las conidias dispersadas por la lluvia. Por tanto, se cree la contribución de la reproducción sexual a la diversidad del patógeno es significativa, además de jugar un importante rol en el desarrollo de epidemias de antracnosis en el cultivo.

Otra posible causa de los resultados obtenidos es atribuida a la migración que conlleva al flujo de genes por dispersión del patógeno. En el cultivo de ñame el intercambio por los

productores de la región del material de siembra que en general corresponde al tubérculo, es considerado una de las principales fuentes de dispersión del patógeno, ya que en el tubérculo pueden reposar los conidios del hongo en forma de acérvulos, hasta encontrar las condiciones óptimas para su liberación, germinación y desarrollo (Abang *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2005; Abang *et al.*, 2006; Sanabria *et al.*, 2010).

Por otro lado y sumado a los resultados obtenidos en la identificación por similitud de las secuencias ITS, la heterogeneidad morfológica y la complejidad genética de la colección podría ser explicada por la presencia del complejo *C. gloeosporioides sensu lato* u otra especie del género involucradas en el desarrollo de la enfermedad (Domínguez-Guerrero *et al.*, 2012)

El conocimiento acerca de la composición y diversidad de una población patogénica, es una herramienta clave para el diseño y selección de estrategias dirigidas a su control (Abang *et al.*, 2002; Abang *et al.*, 2005). Por ejemplo, en la actualidad es de interés la introducción de variedades de ñame resistentes a la antracnosis causada por *C. gloeosporioides*. Para la selección de estas variedades es necesario sean evaluadas con un amplio rango de genotipos patógenos, principalmente los más virulentos. Por otra parte, en el caso del diseño de líneas del cultivo mejoradas, la elección de la estrategia adecuada para inducir resistencia a la enfermedad depende en gran medida de la variabilidad, potencial de recombinación y flujo de genes del patógeno (Abang *et al.*, 2003).

### 4.3 Asociación entre características morfológicas y moleculares

La comparación de los dendogramas obtenidos a partir de los datos de caracterización de la colección, evidenciaron topologías similares y por ende presencia de patrones de agrupamiento conservados entre los aislamientos de *C. gloeosporioides* a nivel morfológico y molecular. Un ejemplo de ello, fue exhibido por los aislamientos DC 1C, DC 12A, DC 20A, DC 20C, DC 20D, DC 20E y DC 21A que se ubicaron en un mismo grupo en los tres análisis efectuados a partir de características morfológicas (Figura 4-4), marcadores moleculares (Figura 4-5) y secuencias ITS (Figura 4-6). Adicionalmente, se observó que este mismo grupo de aislamientos con excepción de DC 1C, fueron seis de los ocho que como se mencionó en el ítem 4.1, presentaron los mismos porcentajes de similitud en las secuencias ITS para las especies *C. gloeosporioides* y *C. alatae*, reportadas en el GenBank. Otro grupo de aislamientos que conservaron el mismo patrón de agrupamiento en los tres análisis realizados fueron DC 11C, DC 14B, DC 15A, DC 16C, DC 16F, DC 17B, DC 18A, DC 18C, DC 19C, DC 20B, DC 37B, DC 16B, DC 25B, DC 25E, DC 26B, DC 26C, DC 27A, DC 28C, DC 30C, DC 31D, DC 35A, DC 38C, DC 38D; dentro de los cuales los primeros once, correspondieron a la totalidad de aislamientos dentro de la colección que arrojaron los mismos valores de máximo de similitud para las especies *C. gloeosporioides* y *C. cliviae*.

Finalmente, la confirmación de las mencionadas relaciones existentes entre aislados y variables evaluadas fue lograda por Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM).



El ACM ejecutado a partir de la matriz resumen de los resultados de caracterización morfológica y molecular de los aislados (Tabla 4-3), permitió definir para el análisis dos factores que explicaron el 87,3% de la variabilidad de la colección (Figura 4-7A). El primer factor (eje x) contribuyó en un 59,6% a la variabilidad, al cual los grupos de datos **Morf.G2**, **Marcadores.G1** e **ITS.G1** (denominación según el nivel de caracterización como se refiere en la Tabla 4-3) aportaron a la inercia del factor el 24,7%, 22,35% y 22,15%, respectivamente. El segundo factor (eje y) contribuyó en un 27,7% a la variabilidad de los datos, este fue representado principalmente por el grupo **Marcadores.G3** que aportó el 79,64% de su inercia (Figura 4-7B).

**Tabla 4-3:** Matriz resumen generada a partir de los resultados de caracterización morfológica y molecular representados por dendogramas.

Muestras	Morf.	Marcadores.	ITS.	Muestras	Morf.	Marcadores.	ITS.
DC1C	G2	G1	G1	DC20C	G2	G1	G1
DC5A	G1	NA	G2	DC20D	G2	G1	G1
DC9E	G1	NA	G2	DC20E	G2	G1	G1
DC11C	G1	G2	G2	DC21A	G2	G1	G1
DC11F	G1	G2	G1	DC21D	G1	G1	G1
DC12A	G2	G1	G1	DC25B	G1	G2	G2
DC14B	G1	G2	G2	DC25E	G1	G2	G2
DC15A	G1	G2	G2	DC26A	G2	G1	G2
DC16B	G1	G2	G2	DC26B	G1	G2	G2
DC16C	G1	G2	G2	DC26C	G1	G2	G2
DC16F	G1	G2	G2	DC27A	G1	G2	G2
DC17B	G1	G2	G2	DC28C	G1	G2	G2
DC17C	G1	G3	G1	DC30C	G1	G2	G2
DC17D	G1	G1	G1	DC31D	G1	G2	G2
DC17E	G1	G3	G1	DC35A	G1	G2	G2
DC18A	G1	G2	G2	DC37B	G1	G2	G2
DC18C	G1	G2	G2	DC38C	G1	G2	G2
DC19C	G1	G2	G2	DC38D	G1	G2	G2
DC20A	G2	G1	G1	DC42A	G2	NA	G1
DC20B	G1	G2	G2	DC46A	G1	G1	G2

**Morf:** Agrupaciones obtenidas a partir de caracteres morfológicos

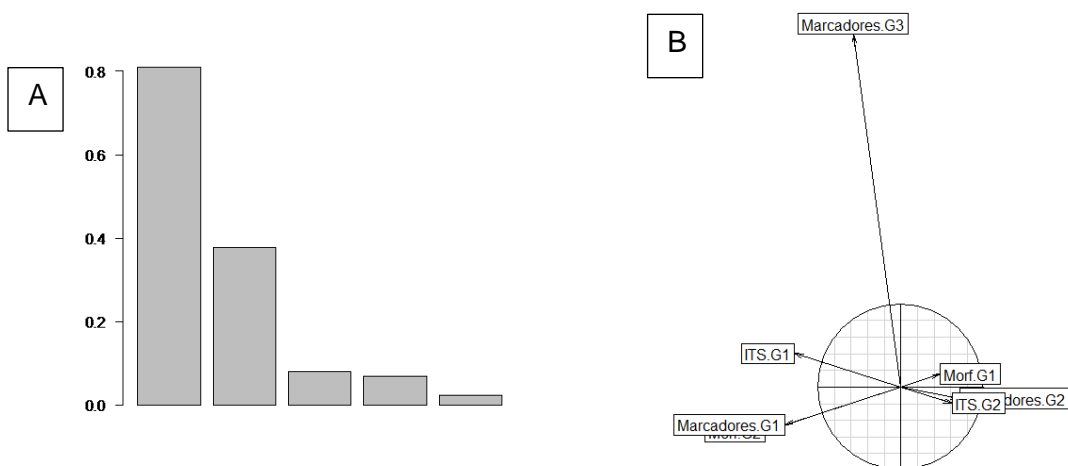
**Marcadores:** Agrupaciones obtenidas a partir de huellas genómica (metodologías ap-PCR y DAF)

**ITS:** Agrupaciones obtenidas a partir de secuencias ITS

**G:** Grupo

Frente a la lejana posición de **Marcadores.G3** respecto al origen de las coordenadas (Figura 4-7B) y su elevada contribución a la construcción del segundo factor, se sospechó que pudiera tratarse de un caso atípico que afectaría gravemente la estabilidad interna de la presentación. La duda fue resuelta realizando un análisis sin este grupo, como resultado el plano y los ejes permanecieron estables, por tanto se descartó su posible atipicidad. Ahora bien, cabe mencionar que la lejana posición de dicho grupo sí

dificultó la interpretación del gráfico, al concentrar el resto de puntos en un área de menor tamaño (Figura 4-8B y C).

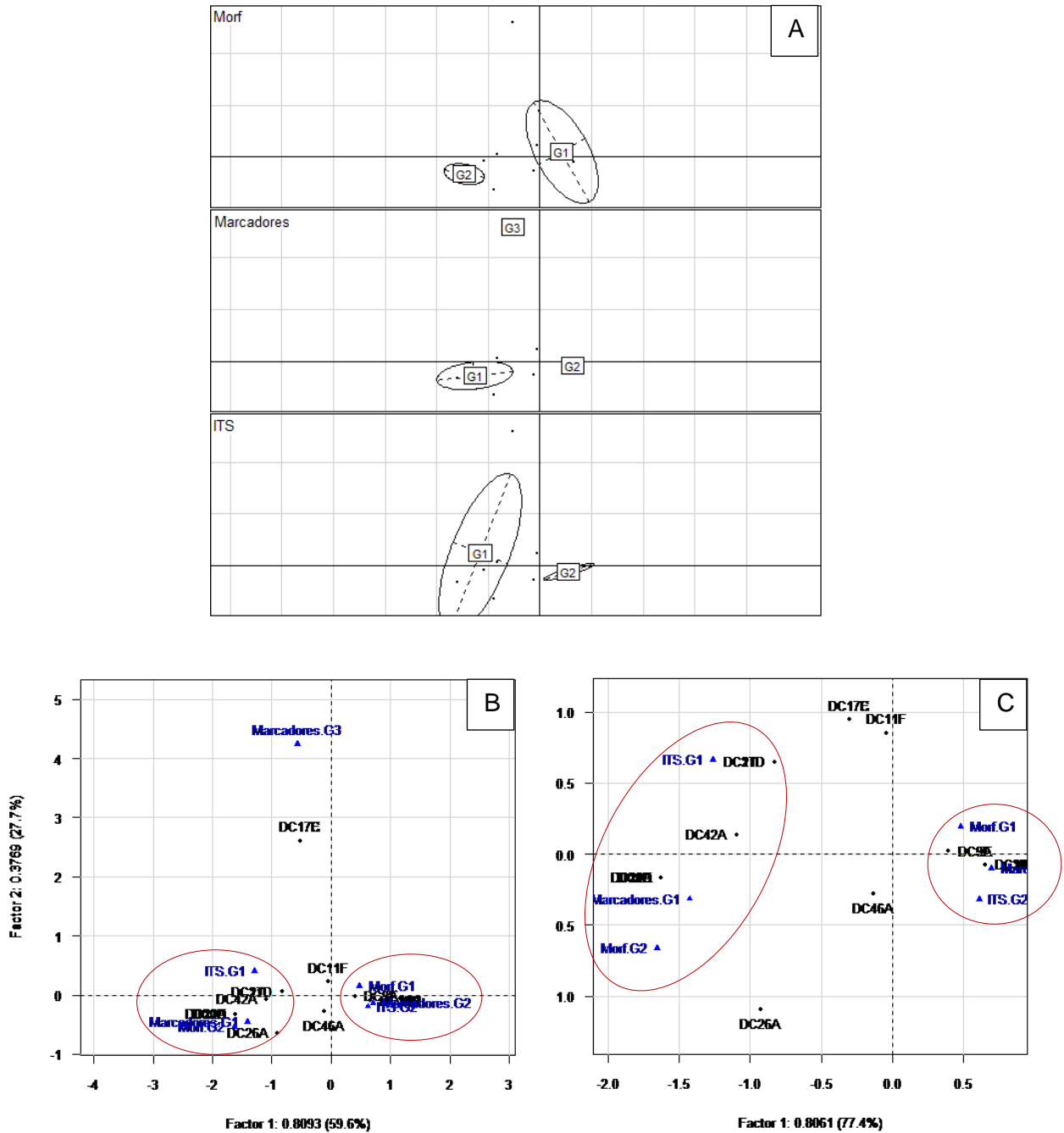


**Figura 4-7:** **A.** Representación de la contribución absoluta de los factores a la dispersión de los datos. **B.** Contribución de categorías a la construcción del primer y segundo factor.

Los resultados de la distribución de las muestras y grupos según el tipo de caracterización en el plano factorial (Figura 4-8A, B y C), permitieron establecer las siguientes asociaciones:

- **Morf.1, Marcadores.2, ITS.2**
- **Morf.2, Marcadores.1, ITS.1**

En cada asociación, los aislados de *C. gloeosporioides* pertenecientes a cada grupo fueron en su mayoría los mismos, resultados que permiten inferir dependencia entre características morfológicas y moleculares de los aislados.



**Figura 4-8:** A. Subnubes de las agrupaciones sobre el plano factorial por cada nivel de caracterización. B. Representación simultánea de la distribución de los datos y grupos formados en cada nivel de caracterización C. Gráfica B sin la categoría **Marcadores.G3**.

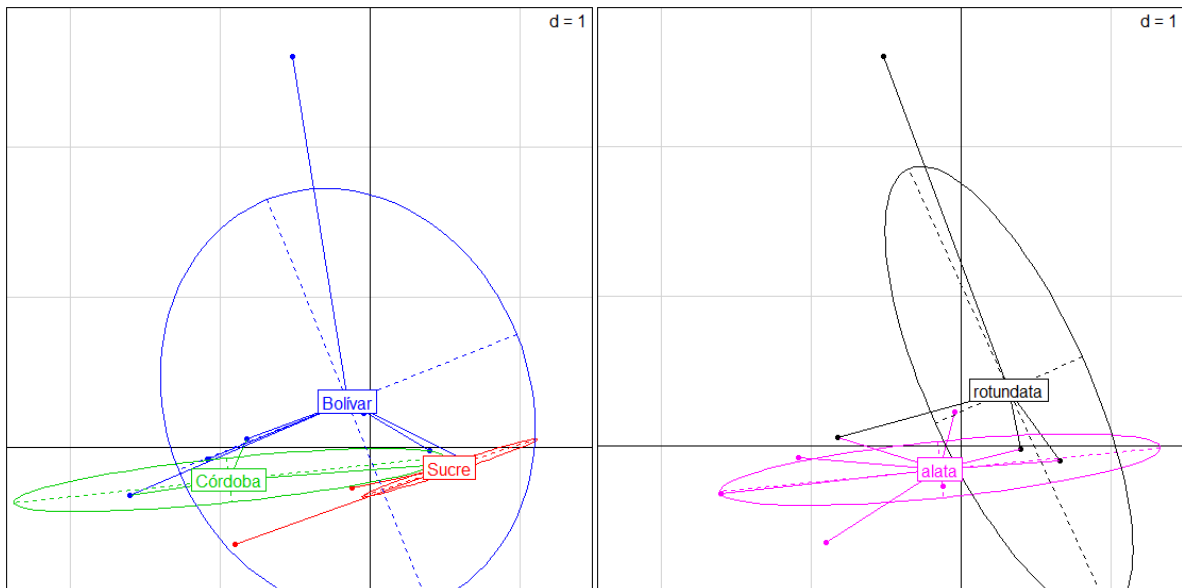
Los resultados previamente descritos coinciden con los reportados por Freeman y Rodríguez (1995), quienes en sus estudios de diferenciación de especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en fresa, encontraron en la mayoría de los casos una correspondencia entre los análisis a partir de la metodología ap-PCR y la identificación morfotaxonomía clásica; por Sreenivasaprasad y cols (1996), quienes en

sus análisis de distancia y parsimonia entre especies del género *Colletotrichum* observaron árboles con topología similar y por Photita y cols (2005), quienes compararon análisis filogenéticos basados en secuencias ITS y características morfológicas de aislados de *C. gloeosporioides* de banana (*Musa acuminata*), jengibre (*Alpinia malaccensis*) y *Euphatorium thymifolia*, encontrando correlación entre los análisis.

El análisis ACM adicional (Figura 4-9), dirigido a conocer si existía alguna relación entre los grupos formados a partir de los datos de caracterización de la colección de *C. gloeosporioides* y la información concerniente a la ubicación geográfica y especie de *Dioscorea* de la cual se aisló el hongo, proyectada en este análisis como variables ilustrativas (Tabla 4.4), no mostró una clara e independiente definición de estas variables. Lo que indicó que no existe un confinamiento de los aislamientos de la colección formada a un lugar geográfico o una relación especie-específica con ñame. En particular, se pudo observar gran variabilidad en cuanto características de los aislados en la finca muestreada perteneciente al departamento de Bolívar en comparación con las muestreadas en los departamentos de Córdoba y Sucre. Así mismo, se obtuvo mayor variabilidad de los datos recopilados para los aislamientos fúngicos aislados de *D. rotundata* que de *D. alata*.

**Tabla 4-4:** Datos de procedencia de la colección de *C. gloeosporioides* aislada de ñame.

<b>AISLADO</b>	<b>VARIEDAD</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	<b>AISLADO</b>	<b>VARIEDAD</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
<b>DC 1C</b>	<i>D. alata</i>	Sucre	<b>DC 20C</b>	<i>D. alata</i>	Córdoba
<b>DC 5A</b>	<i>D. rotundata</i>	Sucre	<b>DC 20D</b>	<i>D. alata</i>	Córdoba
<b>DC 9E</b>	<i>D. alata</i>	Sucre	<b>DC 20E</b>	<i>D. alata</i>	Córdoba
<b>DC 11C</b>	<i>D. alata</i>	Sucre	<b>DC 21A</b>	<i>D. alata</i>	Córdoba
<b>DC 11F</b>	<i>D. alata</i>	Sucre	<b>DC 21D</b>	<i>D. alata</i>	Córdoba
<b>DC 12A</b>	<i>D. alata</i>	Sucre	<b>DC 25B</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar
<b>DC 14B</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar	<b>DC 25E</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar
<b>DC 15A</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar	<b>DC 26A</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar
<b>DC 16B</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar	<b>DC 26B</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar
<b>DC 16C</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar	<b>DC 26C</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar
<b>DC 16F</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar	<b>DC 27A</b>	<i>D. alata</i>	Sucre
<b>DC 17B</b>	<i>D. rotundata</i>	Sucre	<b>DC 28C</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar
<b>DC 17C</b>	<i>D. rotundata</i>	Sucre	<b>DC 30C</b>	<i>D. rotundata</i>	Córdoba
<b>DC 17D</b>	<i>D. rotundata</i>	Sucre	<b>DC 31D</b>	<i>D. rotundata</i>	Bolívar
<b>DC 17E</b>	<i>D. rotundata</i>	Sucre	<b>DC 35A</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar
<b>DC 18A</b>	<i>D. rotundata</i>	Bolívar	<b>DC 37B</b>	<i>D. alata</i>	Sucre
<b>DC 18C</b>	<i>D. rotundata</i>	Bolívar	<b>DC 38C</b>	<i>D. rotundata</i>	Bolívar
<b>DC 19C</b>	<i>D. rotundata</i>	Sucre	<b>DC 38D</b>	<i>D. rotundata</i>	Bolívar
<b>DC 20A</b>	<i>D. alata</i>	Córdoba	<b>DC 42A</b>	<i>D. alata</i>	Sucre
<b>DC 20B</b>	<i>D. alata</i>	Córdoba	<b>DC 46A</b>	<i>D. alata</i>	Bolívar



**Figura 4-9:** Proyección de modalidades ilustrativas correspondientes a datos de procedencia de los aislamientos sobre el plano factorial que representa los datos de caracterización de la colección.

Estos resultados fueron una evidencia adicional al planteamiento de una posible mezcla de poblaciones de *C. gloeosporioides* en cultivos de ñame de la Costa Caribe colombiana.

#### 4.4 Establecimiento de una escala de virulencia

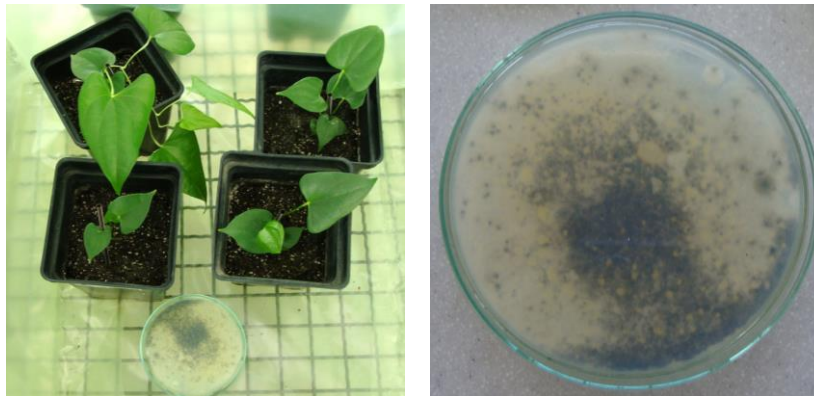
Uno de los parámetros más importantes de la caracterización de *C. gloeosporioides* es su patogenicidad. La identificación de los aislamientos más virulentos de esta especie permitirá la selección de variedades de ñame resistentes a la antracnosis en la costa Caribe colombiana, aportará a la prevención de la dispersión de poblaciones agresivas en la zona (Abang *et al.*, 2002; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2003) y permitirá el estudio de los mecanismos de patogenicidad del hongo asociados al cultivo de ñame, conocimiento que además podría extenderse a la gran gama de hospederos a los que ataca este hongo.

Como etapa inicial en el proceso de caracterización de la colección objetivo de este estudio a nivel de patogenicidad, se realizaron pruebas de patogenicidad y se estableció una escala de virulencia. En el transcurso de esta fase de la investigación el proceso que requirió más atención fue la adaptación de las plántulas de ñame a condiciones *ex vitro*, tan solo un 30% de las plántulas sobrevivieron y mostraron capacidad de crecimiento y desarrollo. Como reporta Chacón en el 2005, la complejidad en el proceso de aclimatación, puede deberse a que el cultivo de tejidos *in vitro* altera algunas características de la plántulas, entre ellas la composición química de la capa epicuticular, la actividad estomáca y la estructura o características fisiológicas de las hojas y tallos; dificultando así la capacidad de adaptación a condiciones externas. Así mismo, aunque se trató en lo posible de semejar las condiciones que favorecen el cultivo, son muchos los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la planta y probablemente no fue posible suplir todos sus requerimientos. Las dificultades propias de la ejecución de pruebas de patogenicidad *ex vitro* para el patosistema *C. gloeosporioides* – ñame,

pueden explicar por qué aún no han sido reportadas en la literatura. A pesar de ello, estas permiten la estimación de una respuesta mucho más cercana a la esperada en campo.

Para llevar a cabo los ensayos de virulencia fue escogido el aislamiento DC 37B al azar de la colección caracterizada. Como prerrequisito para ser empleado se probó su patogenicidad dados los reportes de la presencia de aislamientos de *C. gloeosporioides* avirulentos en cultivos de ñame.

Transcurridos ocho días de infección, la solución de esporas del hongo asperjada en medio PDA, había desarrollado crecimiento micelial hasta cubrir la superficie, prueba que confirmó en primera instancia la viabilidad del inóculo infeccioso. Las características del micelio correspondieron a las descritas para el aislamiento DC 37B original (Figura 4-10). Las primeras manchas irregulares sobre las hojas de las plántulas de ñame fueron observadas 16 días postinfección. El testigo no evidenció síntoma alguno. Estos resultados permiten corroborar la patogenicidad del aislamiento DC 37B (Figura 4-11). El periodo asintomático comprendido entre el día 1 y 16 del desarrollo de la infección inducida en esta prueba fue considerado la fase biotrófica, cuya duración ha sido reportada para el género *Colletotrichum* tanto en cortos (1 a 3 días) como largos periodos, estos últimos posiblemente involucren una etapa de dormancia (Cannon *et al.*, 2012).



**Figura 4-10:** Viabilidad de la suspensión conidial del aislamiento DC 37B, empleada en los ensayos de patogenicidad.



**4-11:** Primeros síntomas causados por el aislamiento DC 37B a las plántulas de ñame, 16 días postinfección.

Una vez probada la patogenicidad del aislado DC 37B, se realizaron los ensayos de virulencia en plántulas de ñame (*D. rotundata*) bajo condiciones de invernadero (Figura 4-12).

- **Ensayo 1 a 5 (E1 – E5):** Inoculación con 2 ml de suspensión de conidios a concentración  $1 \times 10^5$  conidios/ml del aislamiento DC 37B.
- **Ensayo 6 (E6):** Testigo, inoculación con solución tween al 0,05% libre de conidios.

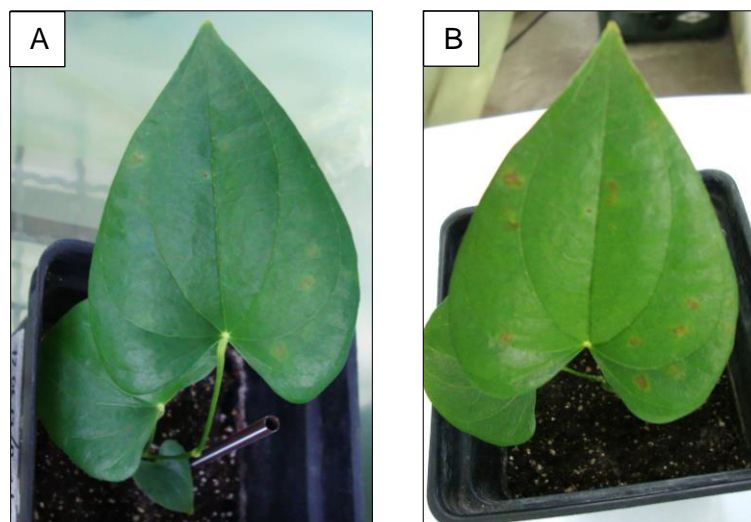
Los síntomas ocasionados por el aislado DC 37B a las plántulas de *D. rotundata*, registrados a los 30 y 60 días postinfección (Figura 4-13), correspondieron a la **Lesión 1** descrita en el ítem 4.1. Los postulados de Koch fueron probados con el reaislamiento del patógeno de la lesión, cuyos rasgos morfológicos coincidieron con la descripción registrada para el aislamiento DC 37B en el proceso de caracterización, estos resultados confirman la responsabilidad del aislado DC 37B en la inducción de síntomas asociados a antracnosis en plantas de ñame (*D. rotundata*). La ausencia de síntomas de la enfermedad en el **Ensayo 6** permitió la validación de los resultados obtenidos.

El seguimiento del desarrollo de la enfermedad de los ensayos de virulencia, confirman las observaciones anotadas en la prueba de patogenicidad.



**Figura 4-12:** Ensayos de virulencia bajo condiciones de invernadero.





**Figura 4-13:** Síntomas causados por el aislado DC 37B a la misma plántula de ñame (*Dioscorea* spp.) **A.** 30 días y **B.** 60 días postinfección.

El porcentaje de área foliar afectada por el aislado DC 37B, arrojó un promedio de 1,2% para la totalidad de hojas de las cinco ensayos inoculados con conidios del hongo. En el Anexo G se presentan todos los resultados obtenidos en la validación de las pruebas de virulencia. Las pruebas de hipótesis para probar normalidad de los datos (Shapiro-Wilk) dentro y entre ensayos mostraron valores-p menores al nivel de significancia 0,05, por tanto fue rechazada la hipótesis de pertenencia de los datos a una distribución normal y fueron aplicadas pruebas no paramétricas para el tratamiento de los datos. La prueba de Kruskal Wallis dentro y entre ensayos reveló valores-p mayores al nivel de significancia 0,05, aceptando la hipótesis de igualdad y concluyendo que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos para el ensayo y sus correspondientes repeticiones (Tabla 4-5).

**Tabla 4-5:** Estadísticos de los datos de porcentaje de área foliar afectas obtenidos para el ensayo de virulencia y sus repeticiones.

Ensayo	Shapiro-Wilk	Kruskal Wallis		
	p-valor	Chi-cuadrado	Grados de libertad	p-valor
E1	0,299	1,982	3	0,576
E2	0,002	0,030	2	0,985
E3	9e-4	2,583	3	0,460
E4	0,003	3,152	3	0,369
E5	0,021	4,062	3	0,255
Entre ensayos	1,684e-8	1,566	4	0,815

Paso seguido se propuso una escala para evaluar la virulencia de *C. gloeosporioides* en cultivos de ñame colombianos (Tabla 4-6), con base en el porcentaje de área foliar calculado para los ensayos con el aislamiento DC 37B y la escala registrada en 2006 por Abang y cols para la evaluación de daños en hojas sueltas de ñame.



**Tabla 4-6:** Escala de virulencia establecida para la especie *C. gloeosporioides* patógena de cultivos de ñame en Colombia

<b>Tipo</b>	<b>Nivel de virulencia</b>	<b>% área foliar afectada</b>
<b>1</b>	Avirulento	0
<b>2</b>	Levemente virulento	1-15%
<b>3</b>	Moderadamente virulento	16- 49%
<b>4</b>	Altamente virulento	≥50%

A partir de los análisis estadísticos y según la escala de virulencia (Tabla 4-6), el aislamiento DC 37B fue catalogado de tipo 2, equivalente a virulencia leve.

Finalmente, partiendo por lo expuesto por Photita y cols (2005); Abang y cols (2006); y Padder y cols (2007), toda la información aquí recopilada aportará a la ejecución de estudios epidemiológicos, entre ellos la estimación de la tasa de migración y dispersión de aislamientos virulentos de *C. gloeosporioides* presentes en la Costa Caribe colombiana.

## 5. Conclusiones y Recomendaciones

A partir de los hallazgos encontrados se sugirió que en el desarrollo de la antracnosis en cultivos de ñame colombianos, podría estar implicado un complejo *C. gloeosporioides sensu lato* y posiblemente otras especies del género *Colletotrichum*. Se hacen necesarios estudios taxonómicos, filogenéticos y de patogenicidad para poner a prueba la hipótesis planteada y para definir con precisión las especies asociadas a la enfermedad.

En este trabajo fueron identificados cuatro síntomas asociados a antracnosis en ñame que afectan a los cultivos de la Costa Caribe colombiana, presentes indistintamente en los cultivos de las especies *Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata*. A partir de estos fue posible aislar la especie fúngica *Colletotrichum gloeosporioides*, objeto de estudios de caracterización.

Dentro de la colección de *C. gloeosporioides* aislada de cultivos de ñame ubicados en la Costa Caribe colombiana fue observada alta variabilidad morfológica y genética. Conocer esta variabilidad es esencial para guiar la toma de decisiones en cuanto a prevención y diseño de estrategias de control eficientes, sostenibles y duraderas. Se sugiere ampliar el número de aislamientos y marcadores moleculares, con el fin de corroborar los resultados expuestos en este trabajo y resolver con mayor detalle las diferencias al interior de la colección.

Los resultados de este trabajo coinciden con publicaciones en las que se demuestra el nivel de complejidad en la caracterización de *C. gloeosporioides*, específicamente asociado a cultivos de ñame, y resaltan la importancia de usar diferentes estrategias como complemento para acercarse a su entendimiento.

Las variables evaluadas y metodologías empleadas para la caracterización morfológica y molecular de la colección, junto con los métodos seleccionados para el tratamiento de los datos, respondieron de manera práctica y satisfactoria para el cumplimiento de los objetivos; con excepción de la variable tamaño de los conidios que mostró ambigüedad, al no permitir una clara diferenciación entre los aislamientos, razón por la cual no se recomienda su uso.

Los análisis de correspondencia múltiple evidenciaron que entre las características morfológicas y las características moleculares evaluadas hay dependencia y esta permite la agrupación de los aislamientos dentro de la colección. Por otra parte, los análisis no mostraron una asociación entre aislamientos o grupos formados por caracterización morfológica y molecular, con los datos de procedencia de los aislamientos,

correspondientes a ubicación geográfica y especie de *Dioscorea* de la cual se aisló el patógeno.

Se generó el primer reporte de pruebas de patogenicidad y virulencia para el modelo *C. gloeosporioides* – ñame en condiciones *ex vitro* en Colombia. Esta metodología junto con la escala de virulencia establecida, permitirá la identificación de los aislados más agresivos con mayor acercamiento al comportamiento del patógeno en campo. Su aplicación y validación permitirá la selección de variedades resistentes de ñame para el control de la enfermedad en la región Caribe colombiana. En la actualidad se esperan los resultados del mismo estudio realizado por el grupo de investigación del IITA, con quienes se trabajará de manera conjunta en la comparación de los datos. Por otro lado si la asociación observada en este estudio entre características morfológicas y moleculares, se extendiera de manera inequívoca al nivel de virulencia, sería posible la identificación fácil, rápida y de bajo costo de aislados virulentos, puesto que el empleo de pruebas de patogenicidad requiere tiempo, costos y esfuerzos considerables.

Todo el conocimiento generado en este trabajo aporta al estudio epidemiológico de la antracnosis en ñame en Colombia.

## ▪ Productos generados

### Publicaciones

Pinzón, Y. A.; Bustamante, S. L.; Buitrago, G. 2013. Diagnóstico molecular diferencial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). Revista Colombiana de Biotecnología. (15)1: 52-60.

### Eventos

The First Global Conference on Yam. 2013. Accra, Ghana.

- Poster: Differential molecular diagnosis of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* in yam (*Dioscorea* sp.)
- Poster: Evaluation of conservation methods for phytopathogenic fungi in yam (*Dioscorea* sp.).

Noveno Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. 2013. Ciego de Ávila, Cuba.

- Ponencia: Diferenciación de aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* causante de Antracnosis en ñame (*Dioscorea* spp.) por PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR).

XXX Congreso Colombiano de Fitopatología y XVI Congreso Latinoamericano de Fitopatología. 2011. Bogotá, Colombia

- Ponencia: Diagnóstico diferencial de patógenos fúngicos implicados en el desarrollo de enfermedades limitantes de los cultivos de ñame en el Caribe colombiano. Bogotá, Colombia.

### Trabajos codirigidos

- Tesis de pregrado, Universidad del Bosque. Caracterización molecular del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de cultivos de ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando la técnica DNA Amplification fingerprinting (DAF).

#### **Informe Colección**

- Ministerio de agricultura y desarrollo rural (MADR) y Banco de genes y cepas IBUN: Colección de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame.

#### **Pasantía Internacional**

- Japan International Cooperation Agency. Kobe-shi Hyogo, Japan. Training course on Agrobiotechnology for Sustainable Agriculture. Project Purpose: To gain information regarding to pathogenicity of *C. gloeosporioides* in yam crops using molecular techniques.

# A. Anexo: Secuencias ITS

## >DC\_1C

TTCGGCGGGTGGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCC  
GCCCGCCCCGGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAG  
GATAACCAAACCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAG  
TGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAAACAACGGAT  
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT  
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCA  
TTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTCAAC  
CCTCAAGCTCTGCTTGGCGTTGGGGCCCTACAGCT  
GATGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCC  
GGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCAC  
TGGGATCCGGAGGGACTCTTGGCGTAAAACCCCA  
ATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC  
CCGCTGAACCTAAGCATATCAAAATGGGGAAGAAG

## >DC\_5A

CTGTTGCTTCGGCGGGTAGGCCGTCCCCTG  
AAAGGACGCCTCCCGGCCCGGAACGGACCCCTC  
GCGGGGCCCGGACCCGGCGCCCGCCGGAGGATAA  
CCAACTCTATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGCA  
TAAGCAAATAATCAAACTTTTAAACAACGGATCTC  
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC  
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT  
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATT  
TGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTC  
AAGCTCTGCTTGGTTTTGGGGCCCAACGGTCCGACGT  
GGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAG  
CCTCCTTTGCGTAGTAACATTTCTGTCACGCACTGGG  
ATCCGGAGGGACTCTTGGCGTATAACCCCAATTC  
TTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG

## >DC\_9E

TTCAACCCTCAAGCTCTGTTGGGTGTTGGGGCCCC  
ACGGTTCGACGTGGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGAC  
CCTCCCGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATTTCTG  
TCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGGCGTAAAA  
CCCCCAATTTTTCAGGGTTGACCGCGGGATCAGG  
TAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGG  
CCGGGAGGAATCACTACTGAGTTACGCTCTATAACC  
CTTTGTGAACATACCCACAACCTGTTGCTTCGGCGGG  
TAGGCCGTCCCTGAAAAGGACGCCTCCCGGCCCGG  
AACGGACCCCTCGCGGGGCGGACCCCGGCGCCCG  
CCGGAGGATAAACAACTCTATTTAACGACGTTTCT  
TTCTGAGTGGCATAAGCAAATAATCAAACTTTTAA  
CAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATGATGAAGAACGC  
AGCGAATGCGATAGTAATGTGAATTGCAGAAATCGT

## >DC\_11C

GTGTTCTCGGAGTACGCTCTTATACCCTTTGTGAC  
ATACCCCAAACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGC  
CCAGCTCCGTCGCCGGAGCCGCGCTCTCGGCGC  
GCCCAACCCGCGGGCGGACCAAACTCTATTTA  
AACGACGCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATC  
AAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC  
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA  
ATTGCAAGTAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG

CACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCC  
TGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTG  
GCGTTGGGGCACTACGGCTCCCGTAGGCCCGGAAA  
TACAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGT  
AGTAACATACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGGGA  
CTCCTGCCGTA AAAACCCCAATTTTCAAAGGTT

## >DC\_11F

CTTTCGGCGGGTGGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGC  
CGCCCGCCCCGGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGA  
GGATAACCAAACCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGA  
GTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAAACAACGG  
ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA  
AATCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA  
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG  
CATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCA  
ACCCTCAAGCTCTGCTTGGCGTTGGGGCCCTACAG  
CTGATGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGACCCTCC  
CGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCA  
CTGGGATCCGGAGGGACTCTTGGCGTAAAACCCCA  
AATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT  
ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAAGGGGGAGA

## >DC\_12A

TTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT  
CAACCCTCAAGCTCTGCTTGGCGTTGGGGCCCTAC  
AGCTGATGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCC  
TCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTACGTCTC  
GCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGGCGTAAAACC  
CCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  
AATACCCGCTGAACCTAAGCATAATGGGGGAGAAA  
AAGAAAATATCTGAGTTTACCGCACTTTATTACCCT  
TTGTGGAGACCCTCCTTTTAAATTTTGGCTTCCGGC  
GGGGGGGGTCTCCGCGACCTCCCGCCCGCCCGCC  
CGGGCGGGTCCGGCCCCCGGAGAAACCAAACCT  
TATAAACGACTTTCTGAGTGTGCTAGCAACAAATA  
GAAAACCTTTAAACAACGGACTTGGTCTGCTTGA  
AGCAGCAATGCGATAGTAATGTGAATTGCAAATCA

## >DC\_14B

GCCTCGGGCGGCGAGCCGGAGCCAGCTCCTCGCC  
CGGAGCCCGCGTCTCGGCGCGCCCAACCCGCGCG  
CGGACCACCAACTCTATTTAACGACGCTCTTCTG  
AGTGGCACAAAGCAAATAATCAAACTTTTAAACAACG  
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC  
GAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA  
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA  
GCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT  
CAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCCTAC  
GGCTTCCGTAGGCCCGGAAATACAGTGGCGGACCC  
TCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATAACCCTC  
GCACTGGGATCCGGAGGGACTCTGCGTAAAACC  
CCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG  
GAATACCCGCTGAACCTAAGCATATAAAAAGGGGG

## >DC\_15A

GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
CGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATG

CCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCCCTT  
GGCGTTGGGGCCCTACGGCTTCCGTAGGCCCGAA  
ATACAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCTTTGCG  
TAGTAACATACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGGG  
ACTCCTGCCGTAACCCCAATTTTCAAAGGTT  
GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA  
GCATATCAAACCCCGAAAGGAAAACTTTATCGAGT  
TACGCTCCTATAACCCCTTTGTGAACATACCCAAA  
CGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGCCTAGCTCCG  
TCGCCGAGCCGCTCTGGGCCACCCGCGCGCGG  
ACCACAACTCTATTTAAACGACGCTCTCTGAGTG  
GCACAAGCAAATAATCAAACCTTTTAAACACGGAT

**>DC\_16A**

GCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTC  
ATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCTC  
TACGGTTGACGTAGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA  
CCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATTTGCT  
CTCGCATTGGGATTCGGAGGGACTCTAGCCGTA  
ACCCCAATTTTACCAAGGTTGACCTCGGATCAGGT  
AGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCATAGAGCC  
GGGAGAGGGGATCATTACTGAGTTACCGCTCATC  
AACCTTTGTGAACATACCTTAAGTGTGCTTCGGC  
GGGTAGGCGTCTAAAAGGACGCTCTCCCGGCCCT  
CTCCGTCCGCGGGTGGGGCGCCCGCGGAGGATA  
ACAACTCTGATTTAACGACGTTTTCTGAGTGACA  
CAAGCAAATAATCAAACCTTTTAAACACGGATCTCT  
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC

**>DC\_16B**

CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAAT  
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCA  
TTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAAC  
CCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCCTACGGCT  
TCCGTAGGCCCGGAAATACAGTGGCGGACCCCTCC  
GGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATACCACCTCGCAC  
TGGGATCCGGAGGGACTCTGCGGTAACCCCGCC  
AATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT  
ACCCGCTGAACCTAAGCATACAATAAGCCGAAGGA  
ACATTATCGAGTTACGCTCCTTATAACCCCTTTGTGAA  
CATACCCCAAACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAG  
CCCAGCTCCGGCGCCGGGAGCCGCATCCGGGGCGC  
TGCCGCGGGGACACTAAACTCTATTTTAAACGA

**>DC\_16C**

ATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  
CACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCC  
TGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTG  
GCGTTGGGGCACTACGGCTTCCGTAGGCCCGGAAA  
TACAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGT  
AGTAACATACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGGGA  
CTCCTGCCGTAACCCCAATTTTCAAAGGTTG  
ACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAG  
CATACGGACTAGCGAGCAGAGGGGGGAATCATTAA  
TCGGAGTTACCGCGCTTCTTTATAACCTTTGGTTG  
AACATAACCCACACGTTGCCCTGGCGGGCAGCC  
CGAGCCAGCTCTCGCCGGGAGCCCTTTTCGGCG  
CGCCACCGCCGACACAACTCTATTTAAACGACAT  
CCTACTCAGTGGGCAGAGCAAATAATCAAACCTTAT

**>DC\_16F**

GTGGATTAGCGAGTACGCTCCTTATACCCTTTGTGA  
CATACCCCAAACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAG  
CCTAGCTCCGTGCGCCGGAGCCGCGTCTCGGCG  
CGCCCAACCCGCGGGGACCACCAAACCTATTT  
AAACGACGCTCTTTCTGAGTGGCACAAGCAAATA  
CAAACCTTTTAAACACGGATCTCTTTGTTCTGGCAT  
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT  
GAATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
CGCACATTGCGCCCGCAGCATTCTGGCGGGCATG  
CCTGTTGAGCGCTCATTCAACCCTCAAGCACCGCT  
TGGCGTTGGGGCCCTACGGCTTCCGTAGGCCCGGA  
AATACAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTG

GTAGTAACATACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGG  
GACTCTGCGCGTAAACCCCGCAATTTTCAAAG

**>DC\_17B**

GTGTCTCGCGAGTACGCTCTTATACCCTTTGTGAC  
ATACCCCAAACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGC  
CTAGCTCCGTGCGCCCGGAGCCGCGTCTCGGCGC  
GCCCAACCCGCGGGCAGCCACCAAACCTATTTA  
AACGACGCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATC  
AAAACCTTTTAAACACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC  
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA  
ATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  
CACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCC  
TGTTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTG  
GCGTTGGGGCCCTACGGCTTCCGTAGGCCCGGAAA  
TACAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGT  
AGTAACATACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGGGA  
CTCCTGCGGTAACCCCGCAATTTTCAAAGGTT

**>DC\_17C**

CTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGCGACCCCTCCCGGC  
CTCCGCTCCGGGCGGGTCCGCGCCCGCCGGAG  
GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTTCTGAG  
TGGTACAAGCAAATAATCAAACCTTTTAAACACGGAT  
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGGGATAAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGAAT  
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCA  
TTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAAC  
CCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT  
GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCCTC  
GGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGCTCGCAC  
TGGGATCCGGAGGGACTCTTGGCGTAAACCCCGCA  
ATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA  
CCCGCTGAACCTAAGCATACAACGGGGGGGG

**>DC\_17D**

GCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGCGACCCCTCCCGG  
CCTCCCGCTCCGGGCGGGTCCGCGCCCGCCGGA  
GGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTTCTGTA  
GGGTACAAGCAAATAATCAAACCTTTTAAACACGG  
ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA  
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGA  
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG  
CATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCA  
ACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAG  
CTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCCTC  
TCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGCTCTCGC  
ACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGGCGTAAACCCCG  
CAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA  
TACCCGCTGAACCTAAGCATACAAGGGGGGG

**>DC\_17E**

TGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCC  
TCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGAT  
GTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGA  
GCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGCTCTCGCACTGG  
GATCCGGAGGGACTCTTCCGTAACCCCGCAATTT  
TCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCC  
GCTGAACCTAAGCATACAAGGGGGGGGGGAGGAA  
AAAATTACTGGAGTTTACCCCTCTACCAACCTTTG  
GTGAAACATACCTTTTAAATGTTGGCTTTTCGGCGG  
GGTAGGGGTTCTCCCGACCCCTCCCGCCTCCCGCC  
CCGCGGGTCCGCCCCGCGGAGATAACCAAACCTG  
ATATAACGACTTCTCTGAGTGGTACAAGCAAATAAT  
CAAACCTTTTAAACACGGACTTGGTCTGCATGATAA  
AAGCAGTATGCGATAGTAATGTGAATTGCAAATCA  
AG

**>DC\_18C**

TCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATCAAACCTTTA  
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC  
GCAGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGAAT  
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGACACATTGCGC  
CCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCG

TCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGG  
CCCTACGGCTTCCGTAGGCCCCGAAATACAGTGGC  
GGACCCTCCCGGAGCTCCTTTGCGTAGTAACATA  
CCACCTCGCATGGATCCGGAGGGACTCCTGCCG  
TAAAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGAT  
CAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAGA  
AGCGACAGAGGGATGGATCATTATCGAGTTACGCT  
CCTTATAACCTTTGTGAACATACCCCAAACGTTGC  
CTCGCGGGCAGCCGGAGCCTAGCTCCGTCGCC

**>DC\_19C**

TTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGCCAGCTCCGTC  
GCCCCGAGCCGCGCTCGGCGGCCCCACCCGC  
CGCGGACCACCAAACTCTATTTAAACGACGTCTCT  
TCTGAGTGGCACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACA  
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGA  
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCA  
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCG  
CCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCA  
TTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCC  
TACGGCTTCCGTAGGCCCCGAAATACAGTGGCGGA  
CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATACCAC  
CTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTAAA  
ACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGG  
TAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAAAGC

**>DC\_20A**

TCGGCGGGTGGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCCG  
CCCGCCCCGGGCGGGTCCGCGCCCCGCCGGAGG  
ATAACCAAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGT  
GGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACAACGGAT  
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAA  
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAAT  
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCA  
TTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTTAAC  
CCTCAAGCTCTGCTTGGCGTTGGGGCCCTACAGT  
GATGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCTCCC  
GGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCAC  
TGGGATCCGGAGGGACTCTTGGCCGTAACCCCCCA  
ATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA  
CCCGCTGAACCTAAGCATATCAAAAGCCGGGAGA

**>DC\_20B**

TGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGCCTAGCTCCGTCG  
CCCGGAGCCGCGTCTCGGCGGCCCCACCCGCC  
GGCGGACCACCAAACTCTATTTAAACGACGTCTCT  
CTGAGTGGCACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACA  
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGA  
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCA  
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCG  
CCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCA  
TTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCC  
TACGGCTTCCGTAGGCCCCGAAATACAGTGGCGGA  
CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATACCAC  
CTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTAAA  
ACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGG  
TAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCTAGG

**>DC\_20C**

CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  
TTGCGCCCCGAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTT  
CGAGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGCGT  
TGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTTAAAGGTA  
TGCGCGGACCCTCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTA  
ACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCT  
TGCCGTAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTC  
GG  
ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATACTA  
AACGGGAAAAAGAGAAAAATTAAGTGTATACCCCT  
CTTATTAACCTTTTGGGAAACATTACCTTTTAATTG  
TTGGCTCCGCGGGGGGGGGTCTCCGCGAACCCCTC  
CCGCGCCGCCCCCGGGCGGGTCCGCCCCGCC  
GGAGGATAACCCAAACTCTGATTAACGACTTCTCT  
GAGTGGTACAAGCAAATATCAAACTTTACACGGAC

**>DC\_20D**

GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCG  
AGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGCGTTG  
GGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTTAAAGGTAGT  
GGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC  
CTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTG  
CCGTAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGG  
ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA  
TAAGGCCGGAGAGAAATCATTACTGAGTTTACGCTC  
TATAACCCTTTGTGAAACATACTATAATGTTGCTTC  
GGCGGGTGGGGTCTCCGCGACCTCCCGCCGCCG  
CCCCGGCGGGTCCGCGGCCGCCGGAGATAACCAA  
CTCTGATTAACGACTTTCTCTGAGTGGTACAAGCAA  
ATATCAAACTTTTACACGGACTTGGGTTCTGCATG

**>DC\_20E**

AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCG  
AGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGCGTTG  
GGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTTAAAGGTAGT  
GGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC  
CTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTG  
CCGTAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGG  
ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA  
TAAACCCGGAGAGAAACATTACTGAGTTTACGCTCT  
ATAACCCCTTTGTGAACATACTATGACTGTTGCTTCG  
GCGGGTGGGGTCTCCGCGACCTCCCGCCGCCGCC  
CCGCGGGTCCGCGCCCCGCCGGAGATAACCAAAC  
TCTGATTTAACGACTTTCTCTGAGTGGTACAAGCAA  
ATAATCAAACTTTTACACGGACTTGGGTTCTGCA

**>DC\_21A**

GTGTTCCGGCGTTACGCTCTATACCCTTTGTGACATA  
CCTATAACTGTTGCTTCCGCGGGTGGGGTCTCCCG  
GACCCTCCCGGCCGCCGCCGCCGGGCGGGTCCG  
CGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTGATTTAACG  
AGTTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAA  
CTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATTGATG  
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG  
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  
TTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTT  
CGAGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGCGT  
TGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTTAAAGGTA  
GTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTA  
ACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCT  
TGCCGTAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCT

**>DC\_21D**

GGGCATCAGGAGTTCGCTCTATACCCTTTGTGACAT  
ACCTATAACTGTTGCTTCCGCGGGTGGGGTCTCCG  
CGACCCTCCCGGCCGCCGCCGCCCGGGCGGGTCCG  
GCGCCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTGATTTAAC  
GACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAA  
ACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATTGAT  
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT  
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC  
ATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGT  
TCGAGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGCG  
TTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTTAAAGGT  
AGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGT  
AACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTC  
TTCCGTAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGAC

**>DC\_25B**

CATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTTCA  
ACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCCTACGG  
CTTCCGTAGGCCCCGAAATACAGTGGCCGACCCTC  
CCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATACCACTCCG  
ACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTAACCC  
CCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA  
ATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGACGGAA  
GAATCTTATCGAGTTACCGCTCTATAACCCCTTTGT  
GAACATAACCCCAAACGTTGCTCCGCGGGCAGCCG

GAGCCCAGCTCCGGCGCCGGAGCCGCTCTCGC  
CTGCGCCGGCGGACCCTAAACTCTATATAACGAA  
ATCTCTCAGTGGGTACAAGCAAATAAATCAAAA  
CTTTGTTACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCCAT  
GAAGAACGCAGCGCAAATGCGATAATTATGTGTGA

**>DC\_25E**

GGGCAAAGCGAGTACGCTCCTTATACCCTTTGTGAA  
CATACCCCAAACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAG  
CCTAGCTCCGTCGCCCCGAGCCGCGCTCTCGGCG  
CGCCCCACCCGCGCGGGACCACCAAACCCCTATTT  
AAACGACGTCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAAT  
CAAAAATTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT  
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT  
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
CGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATG  
CCTGTTTCGAGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCACCCT  
TGGCGTTGGGGCCCTACGGCTTCCGTAGGCCCCGGA  
AATACAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGC  
GTAGTAACATAACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGG  
GACTCCTGCCGTA AAAACCCCAATTTTCAAAGG

**>DC\_26A**

ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAATTTCAA  
CCCTCAAGCACCCTTGGCGTTGGGGCCCTACGGC  
TTCCGTAGGCCCGGAAATACAGTGGCGGACCCTCC  
CGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATAACCACCTCGCA  
CTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTA AAAACCCCA  
CAATTTATCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT  
ACCCGCTGAACCTAAGCATATCGAAAACGGGGGA  
GGAAAAATTATCGAGTTACGCTCCTTATAACCCTTTG  
TGAACATAACCTCAACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCG  
GAGCCCAGCTCCGGCGCCCGAGCCGCTTCTCG  
GCGCGCCCCACCCGCTCCGCAAAACCACTAAACTCT  
ATCGCCACGACGCTGCTGAGATGGCTAAAGCAA  
ATAATCTATACTTTTAAACAACGGATCTGTGGTTCTCG  
ATCGATAAAAACGCAGCGAAATGCGATAGTAATGT

**>DC\_26B**

CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT  
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCA  
TTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAAC  
CCTCAAGCACCCTTGGCGTTGGGGCACTACGGCT  
TCCGTAGGCCCGGAAATACAGTGGCGGACCCTCCC  
GGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATAACCACCTCGCAC  
TGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTA AAAACCCCA  
AATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT  
ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGGAGGA  
AAGATCATTATCGAGTTACCGCTCCTTATAACCCTTT  
GTGAACATAACCCAAACGTTGCCTCGGCGGGCAGC  
CGGAGCCCAGCTCCGTGCGCGGAGCCGCTCGCG  
GCCACCCGCGGGGACACCAAACCTCTATTTAA

**>DC\_26C**

GGGGAAATCGAGTACGCTCCTTATACCCTTTGTGA  
CATACCCCAAACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAG  
CCTAGCTCCGTCGCCCCGAGCCGCGCTCTCGGCG  
CGCCCCACCCGCGGGCAGCCACCAAACCTCTATTT  
AAACGACGTCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAAT  
CAAAAATTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT  
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT  
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
CGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATG  
CCTGTTTCGAGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCACCCT  
TGGCGTTGGGGCCCTACGGCTTCCGTAGGCCCCGGA  
AATACAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGC  
GTAGTAACATAACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGG  
GACTCCTGCCGTA AAAACCCCAATTTTCAAAGG

**>DC\_27A**

GCTTCGGCGGGTAGGCCGTCCCCTGAAAAGGACGC  
CTCCCGGCCCGGACCGGACCCCGCGGGACCGG  
ACCCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTATT  
GTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGCATAAGCAAATA

ATCAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA  
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT  
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
CGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATG  
CCTGTTTCGAGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCTCTGCT  
TGGTGTGGGGCTCTACGGTCGACGTAGGCCCTCA  
AAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGC  
GTAGTAACATTTTCGTCTCGCACTGGGATCCGGAGG  
GACTCTTGGCGTAAAACCCCAATTTTCAAAGG  
TGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT

**>DC\_28C**

GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
CGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATG  
CCTGTTTCGAGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCACCCT  
TGGCGTTGGGGCACTACGGCTTCCGTAGGCCCCGGA  
AATACAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGC  
GTAGTAACATAACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGG  
GACTCCTGCCGTA AAAACCCCAATTTTCAAAGG  
TGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA  
AGCATATCAAAAAGGCGCAGAGGATGAATCATTAT  
GAGTTACCGCTCCTTATAACCCCTTTGTGAACATACC  
CAAACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGCCAG  
CTCCGTGCGGGGAGCGCTTCTCGCCCCCCCCGCG  
CGGGACCAAACTCTATTTAAACGACGTCTCTCTG  
AGTGGCACAAGCAAATAATCAAAAATTTTAAACAA

**>DC\_30C**

CCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCG  
TCATTTCAACCCTCAAGCACCCTTGGCGTTGGGG  
CCCTACGGCTTCCGTAGGCCCGGAAATACAGTGGC  
GGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATA  
CCACCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCC  
TAAAACCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGAT  
CAGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCATA  
AGGCGAGAAGCAGGTAATCATTATCGAGTTACCGCT  
CCTTATAACCCCTTTGTGAACATAACCCAAACGTTGC  
CTCGGCGGGCAGCCGGAGCCTAGCTCCGTGCCCC  
GGAGCCGCGTCTCGGCCCGCCGCGGGGACCAC  
AAACTCTATTTAAACGACGCTCTCTACTGTCGAC  
AAGCAAATAAATCAAAACTTGTAAACAACGGAATCTC  
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCACGCAAATGC

**>DC\_31D**

TGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGCCAGCTCCGTCCG  
CCCGGAGCCGCGTCTCGGCGCGCCCCACCCGCG  
GGCGGACCACCAAACCTCTATTTAAACGACGCTCTCT  
CTGAGTGGCACAAGCAAATAATCAAAAATTTTAAAC  
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA  
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC  
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCG  
CCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  
TTTCAACCCTCAAGCACCCTTGGCGTTGGGGCAC  
TACGGCTTCCGTAGGCCCGGAAATACAGTGGCGGA  
CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATAACCAC  
CTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTA  
AACCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGG  
TAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAGC

**>DC\_35A**

ACCTCAAGCACCCTTGGCGTTGGGGCCCTACGG  
CTTCCGTAGGCCCGGAAATACAGTGGCGGACCCTC  
CCGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATAACCACCTCGC  
ACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTA AAAACCC  
CCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA  
ATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATGCGACGCA  
TGAATGTAATTTATCGAGTTACGCTCCTTATAACCC  
TTTGTGAACATAACCCAAACGTTGCCTCGGCGGGC  
AGCCGGAGCCAGCTCCGGCGCCCGGAGCCGCGT  
TCTCGGCGCCCCCGCGGGCAGACTAAACTCTATA  
TAAACGACTTCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATA  
TAAAACCTTTTATCAACGAGGACTCTGGTTCTCG  
CATCGAATAAAAACGCACGAAATGCGATAAGTTAA  
TGGTGAAGTTGAAAATTTTGTAGTATCAACCTA



**>DC\_37B**

CAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT  
 TTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCACT  
 ACGGCTCCGTAGGCCAAAAAGAGGGCGGACC  
 CTCCGAAAGGTCTTGCACCAACACAGACGCCCC  
 CGGGGAGATCGAGAGACTGCCCGCAACCCC  
 AAATTTCCAAAGGTTTACAACGGATCAAGGGGGAA  
 TACCCGCTGAACCTAATCATATCAATAGGCGGAGGA  
 GAAAAAATCATTATCGAGTTACGCTCCTTATAACCC  
 TTGTGAACATACCCAAACGTTGCCTCGGCGGGCAG  
 CCGGAGCCCAGCTCCGTGCCCCGGAGCCCCGTCC  
 CCCCCCCCCCGGCGAACACCAAACCTATTTAAA  
 CAACGTTTCTACGGAGGTGGCAAGCAAAATAATCA  
 AACTTGTTAAACAAGAATCTCTTGGGTTATGGGCA  
 TCATTGAAGAACCAGCGCAAATGGCGAATAAGTAA

**>DC\_38C**

TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA  
 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA  
 TCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC  
 GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAG  
 CACCGCTTGGCGTTGGGGCCCTACGGCTCCGTAG  
 GCCAGAAATACAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTC  
 CTTTGCCTAGTAACATACCACTCGCACTGGGATCC  
 GGAGGGACTCCTGCCGTAAAACCCCAATTTTCCA  
 AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG  
 AACTTAAGCATATCAATAAACGGAGGAATCTTATCG  
 AGTTACGCTCCTTATAACCCCTTTGTGAACATACCCC  
 AAACGTTGCCGCGGGCAGCCGGAACCCAGCTC  
 CGGCGCCGGGAGCCGCTTTCTGGCCTTGCCCCC  
 CGCCAAAAACCTCTATTTTAAACGAAGTTCCAG

**>DC\_38D**

TGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGCCTAGCTCCGTCG  
 CCCGGAGCCGCGTCTCGGCGCGCCCCACCCGCC  
 GCGGACCACAACTCTATTTAAACGACGTCTCTT  
 CTGAGTGGCACAAAGCAAAATCAAACTTTTAAACA  
 ACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCA  
 GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA  
 GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC

CCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  
 TTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCC  
 TACGGCTTCCGTAGGCCCGGAAATACAGTGGCGGA  
 CCTCCCGGAGCCTCCTTTCGCTAGTAACATACCAC  
 CTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTAA  
 ACCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACC

**>DC\_42A**

CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  
 TTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTT  
 CGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT  
 TGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTA  
 GTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTA  
 ACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTT  
 GCCGTAAAACCCCAATTTCTCAAAGGTTGACCTCG  
 GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAAGCATATC  
 AAAAAGCCGGAGAGATCATTACTGAGTTTACGCT  
 CTACAACCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT  
 GGCGGGTAGGGTCTCGCGACTCCCGGCCTCCC  
 GCCCGGGCGGGTCCGCGCCCGCCGGAGGATAAC  
 CAAACTCTGATGTAACGACTTTCTTCTGAGTGGTAC  
 AAGCAATAATCAAACCTTTTAAACGGACTTGGT

**>DC\_46A**

TTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGCCAGCTCCGGC  
 GCCCGGAGCCGCTTCTCGGCGCGCCCCACCCGC  
 CGGCGGACCACTAACTCTATTGCAACGACGTCTCT  
 TCTGAGTGGTACAAGCAATAATCAAACCTTTTAAACA  
 ACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCA  
 GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA  
 GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC  
 CCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  
 TTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCC  
 TACGGCTTCCGTAGGCCCGGAAATACAGTGGCGGA  
 CCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATACCAC  
 CTGCACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTAA  
 ACCCCCAATTTATCAAGGTTGACCTCGGATCAGGT  
 AGGAATACCCGCTGAACCTTAAAGCATATCTAAAAGG  
 GGG

## B. Anexo: Identificación por similitud de secuencias ITS

Aislado	Secuencia ID	Descripción	Cobertura	E-value	Máximo de identidad
DC 1C	<a href="#">emb AJ311880.1 </a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 5A	<a href="#">gb JX258674.1 </a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
DC 9E	<a href="#">gb JX258674.1 </a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
DC 11C	<a href="#">gb KC565723.1 </a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%

	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 11F	<a href="#">emb AJ311880.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb JX010191.1</a>	<i>Colletotrichum alatae</i>	100%	0.0	100%
DC 12A	<a href="#">emb AJ311880.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
	<a href="#">gb JX010191.1</a>	<i>Colletotrichum alatae</i>	100%	0.0	100%
DC 14B	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 15A	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 16A	<a href="#">gb EU056738.1</a>	<i>Colletotrichum capsici</i>	100%	0.0	100%
DC 16B	<a href="#">gb FJ172224.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 16C	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 16F	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 17B	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 17C	<a href="#">gb KF147906.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 17D	<a href="#">gb KF147906.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 17E	<a href="#">gb KF147906.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 18A	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 18C	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 19C	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 20A	<a href="#">emb AJ311880.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb JX010191.1</a>	<i>Colletotrichum alatae</i>	100%	0.0	100%
DC 20B	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb KC843780.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
DC 20C	<a href="#">emb AJ311880.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb JX010191.1</a>	<i>Colletotrichum alatae</i>	100%	0.0	100%
DC 20D	<a href="#">emb AJ311880.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb JX010191.1</a>	<i>Colletotrichum alatae</i>	100%	0.0	100%
DC 20E	<a href="#">emb AJ311880.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb JX010191.1</a>	<i>Colletotrichum alatae</i>	100%	0.0	100%
DC 21A	<a href="#">emb AJ311880.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb JX010191.1</a>	<i>Colletotrichum alatae</i>	100%	0.0	100%
DC 21D	<a href="#">emb AJ311880.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
	<a href="#">gb JX010191.1</a>	<i>Colletotrichum alatae</i>	100%	0.0	100%
DC 25B	<a href="#">gb FJ172224.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%

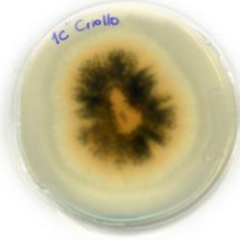
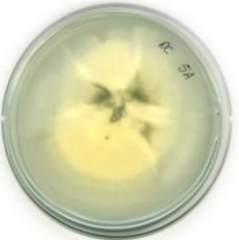

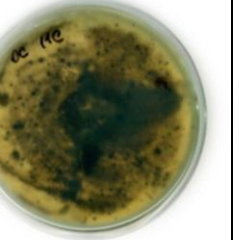
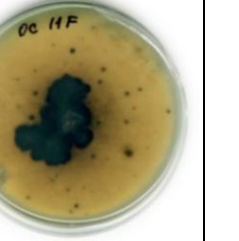

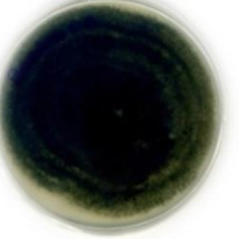
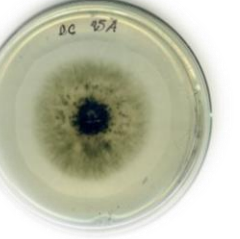
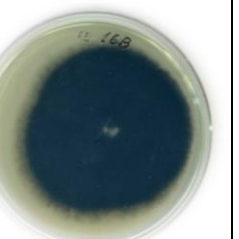
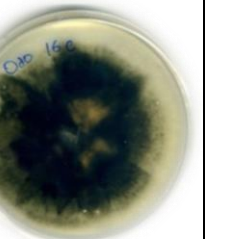
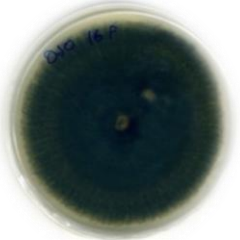
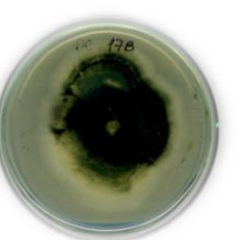

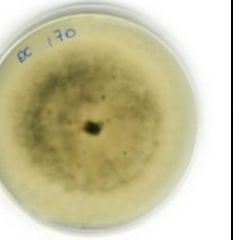
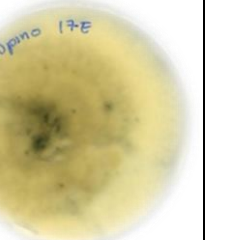
DC 25E	<a href="#">gb JX902436.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 26A	<a href="#">gb JN687987.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
DC 26B	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
DC 26C	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 27A	<a href="#">gb JX258737.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 28C	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
DC 30C	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
DC 31D	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
DC 35A	<a href="#">gb JX867216.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 37B	<a href="#">gb JF710548.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98%	3e-160	96%
	<a href="#">gb HM585398.1</a>	<i>Colletotrichum cliviae</i>	98%	3e-160	96%
DC 38C	<a href="#">gb FJ172224.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%
DC 38D	<a href="#">gb KC565723.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 42A	<a href="#">gb DQ454005.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%
DC 46A	<a href="#">gb JN687987.1</a>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	99%

### C. Anexo: Matriz mixta de variables morfológicas empleadas para la caracterización de *C. gloeosporioides*

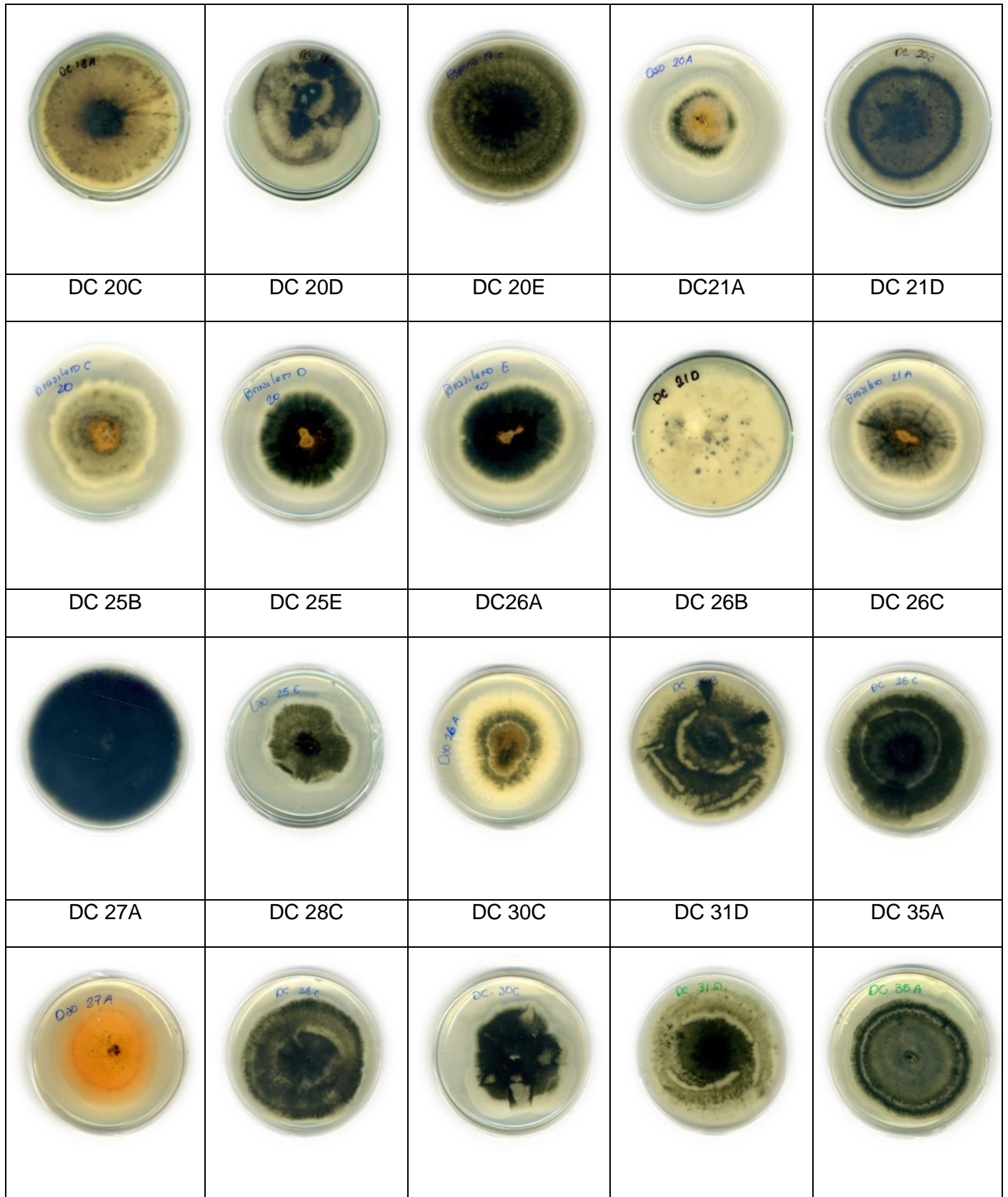
Mx	Crecimiento (mm/día)	Color	Acérvulos	Forma	Largo (µm)	Ancho (µm)
DC1C	11,6	1	0	1	19,39	3,61
DC5A	11	4	1	1	12,8	4,2
DC9E	11,6	4	1	1	11,77	4,08
DC11C	15,1	4	1	3	17,38	4,05
DC11F	15,2	2	1	1	16,33	3,33
DC12A	10,4	1	0	3	15,26	4,04
DC14B	16,6	5	1	1	16,45	4,38
DC15A	13	5	1	3	14,35	4,8
DC16B	14	5	1	1	13,43	4,18
DC16C	15	1	1	4	15,95	4,64
DC16F	14,4	5	1	1	16,23	4,61

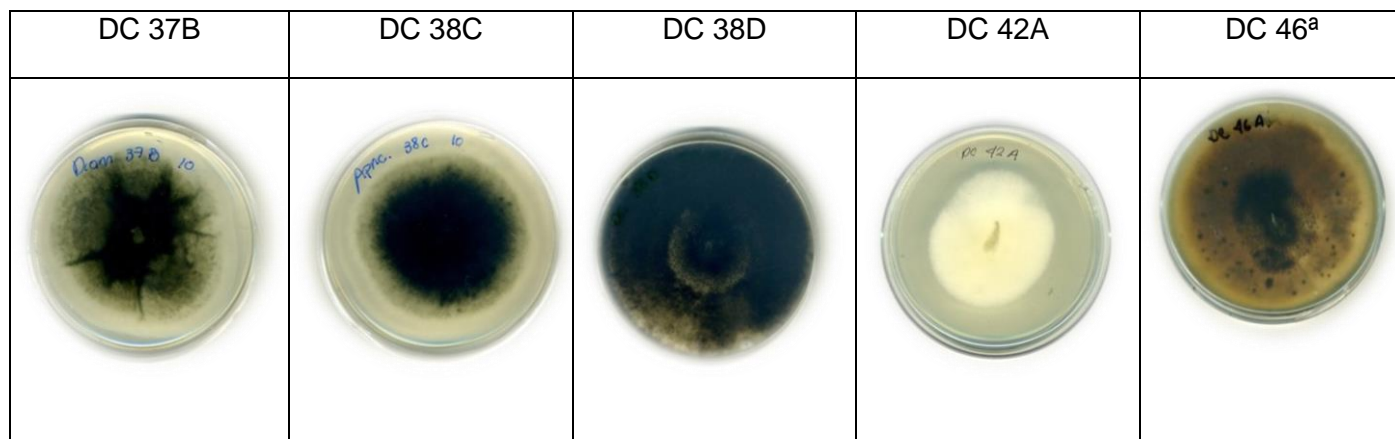
DC17B	11	5	0	2	18,62	4,9
DC17C	11	4	1	4	17,11	5,5
DC17D	14,6	4	1	3	14,8	4,18
DC17E	15,6	4	1	3	13,7	3,4
DC18A	15,4	4	1	3	17,08	4,33
DC18C	13	5	1	3	13,89	4,97
DC19C	15,2	5	1	1	17,89	4,37
DC20A	11,4	1	0	3	17,17	3,16
DC20B	14,6	5	0	1	17,24	4,2
DC20C	9,8	1	1	1	19,16	3,41
DC20D	9,3	1	0	5	16,84	4,56
DC20E	10,8	1	0	1	18,78	3,48
DC21A	9	1	0	1	19,04	3,76
DC21D	16	4	1	1	11,47	2,6
DC25B	14,1	5	1	1	12,37	4,7
DC25E	12,8	5	1	1	16,58	4,94
DC26A	13,4	1	0	3	14,37	3,56
DC26B	15	5	1	3	14,49	3,86
DC26C	13,2	5	1	1	16,22	4,91
DC27A	11,2	3	1	1	14,65	5,5
DC28C	14,8	5	1	1	17,47	5,33
DC30C	12,5	5	1	1	16,28	4,86
DC31D	16,6	5	1	1	17,18	4,67
DC35A	15	5	1	3	15,18	4,16
DC37B	15	5	1	4	16	4,14
DC38C	9,8	5	1	4	17,03	5,15
DC38D	15	5	1	1	14,13	4,14
DC42A	11	4	0	3	14,78	2,69
DC46A	14,1	2	1	1	13,19	3,72

## D. Anexo: Registros macroscópicos de la colección

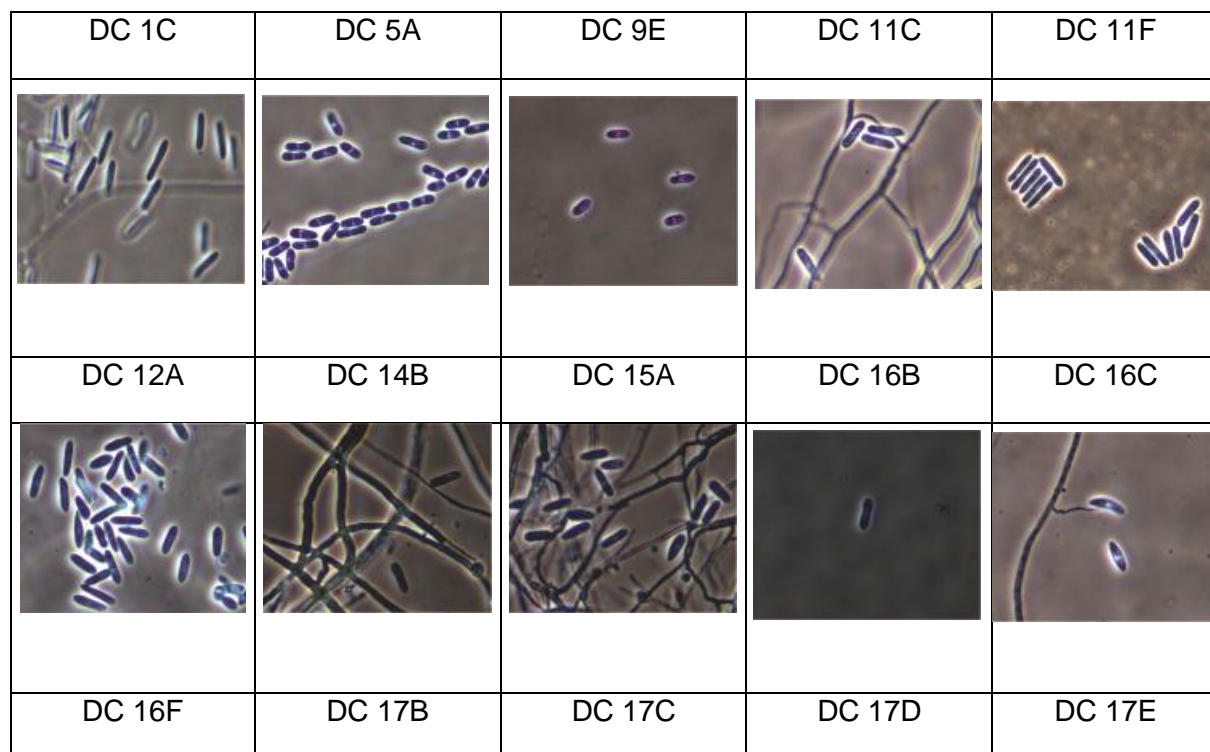
DC 1C	DC 5A	DC 9E	DC 11C	DC 11F
				
DC 12A	DC 14B	DC 15A	DC 16B	DC 16C
				
DC 16F	DC 17B	DC 17C	DC 17D	DC 17E
				
DC 18A	DC 18C	DC 19C	DC 20A	DC 20B

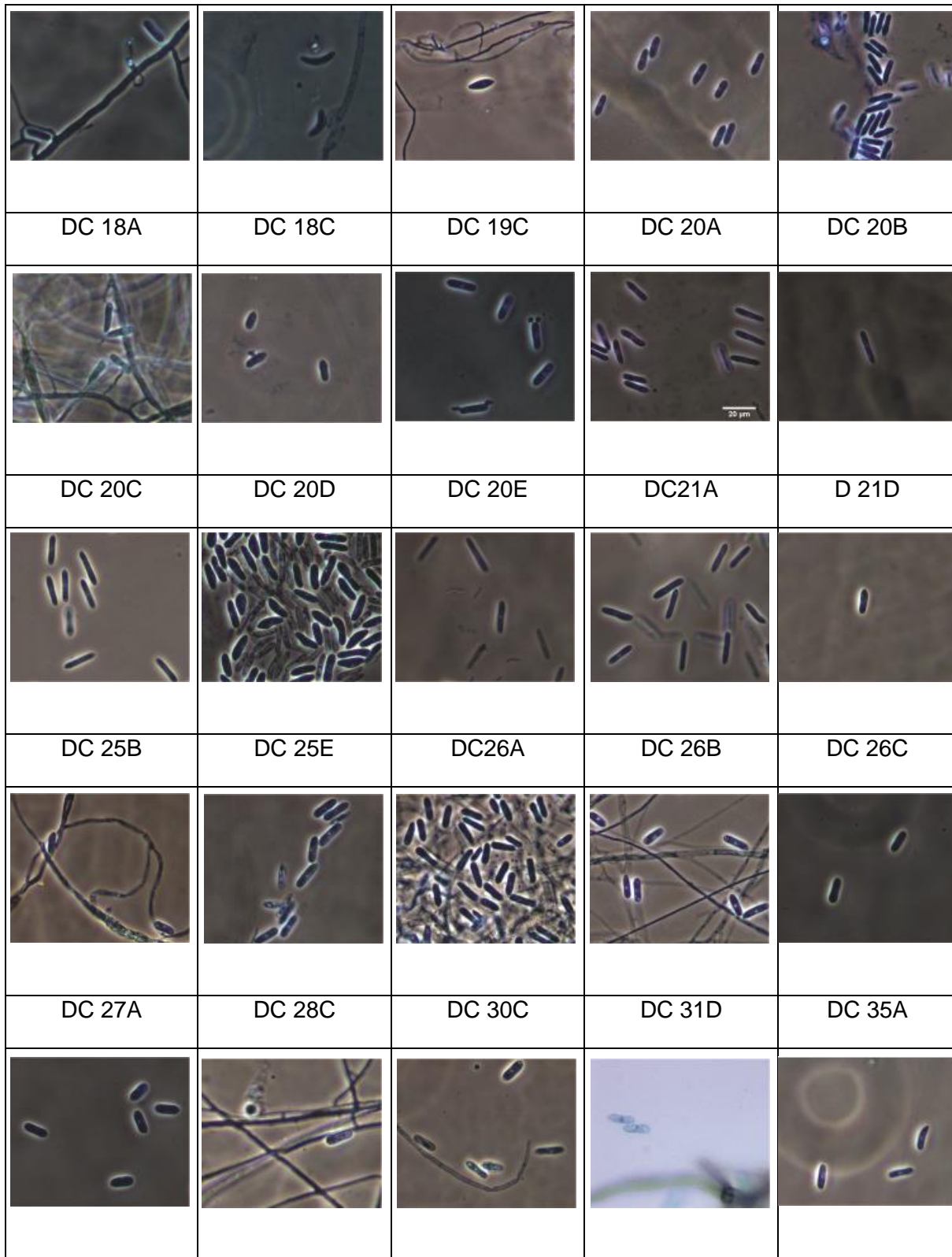




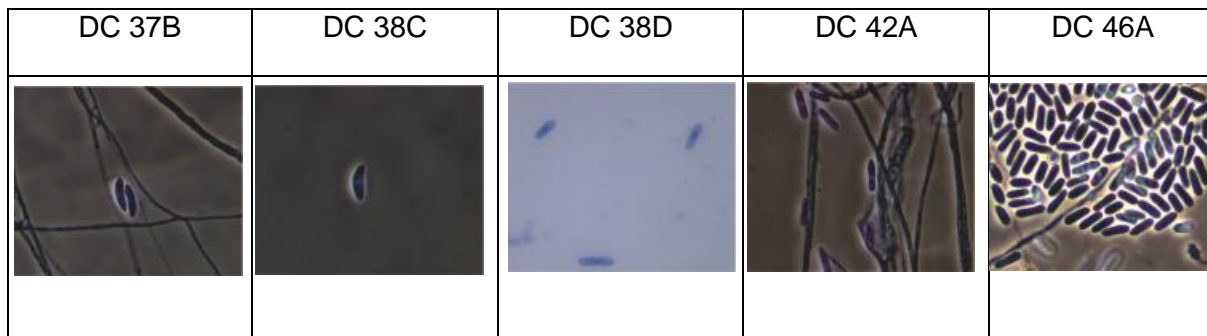


## E. Anexo: Registros Microscópicos de la colección

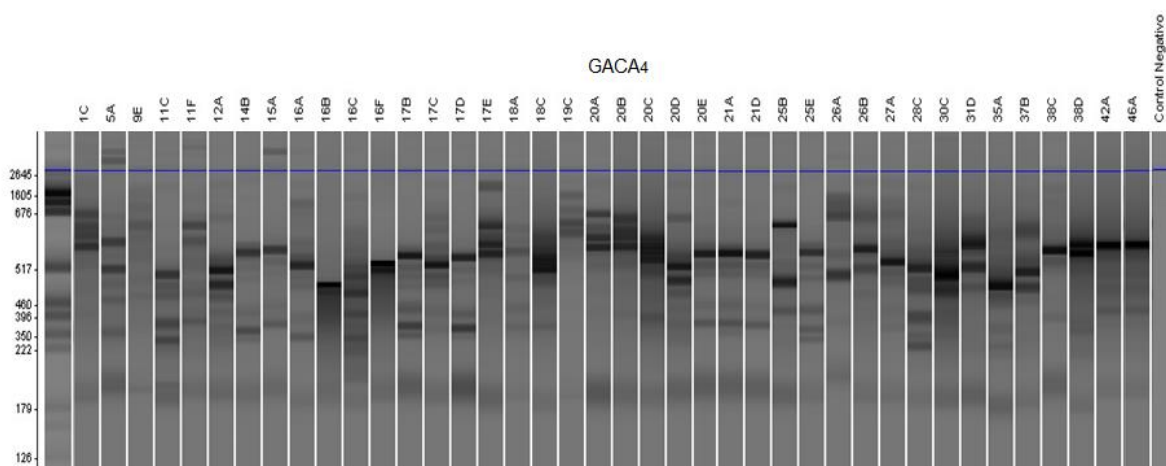


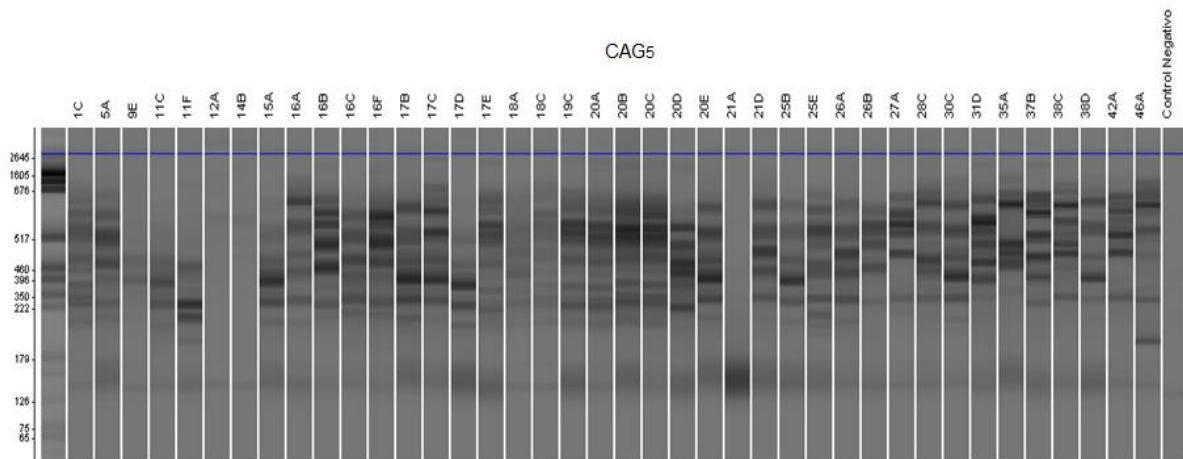
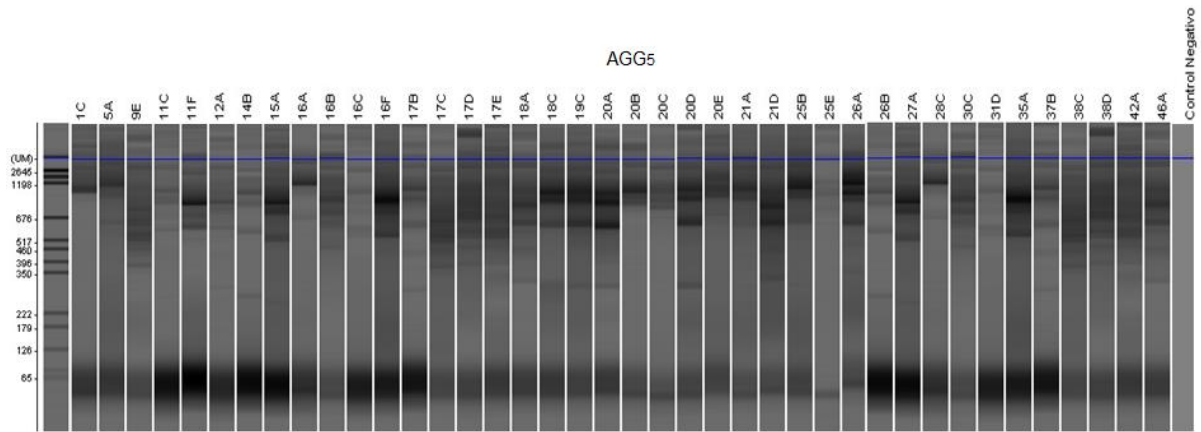


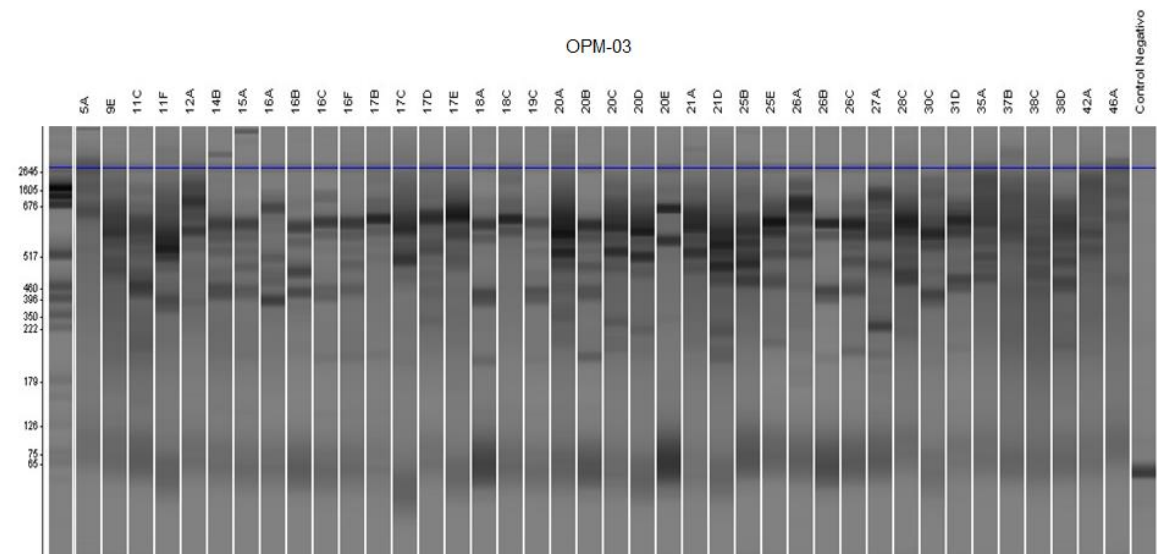
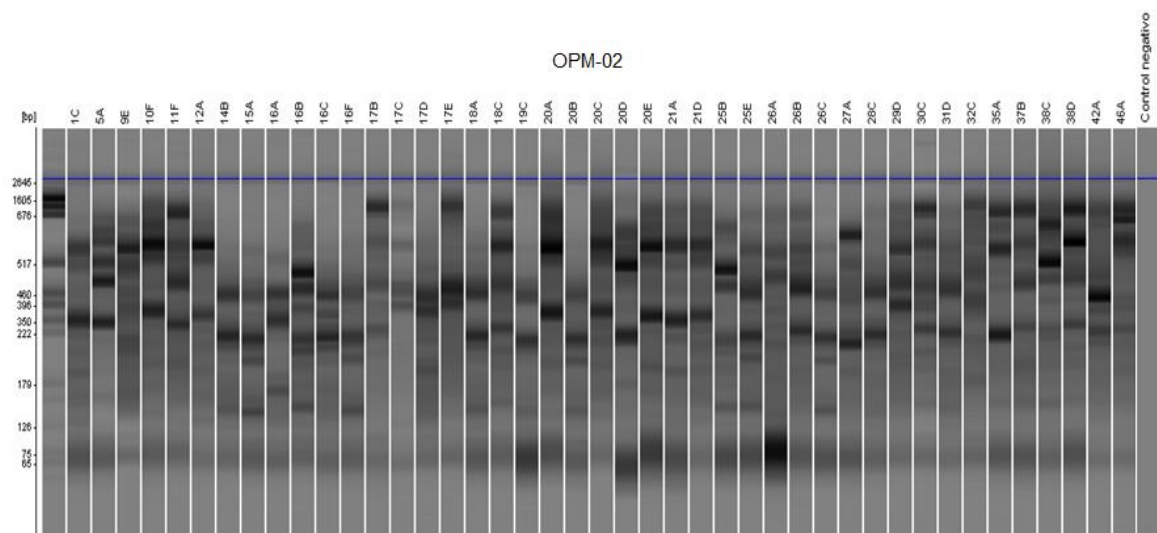
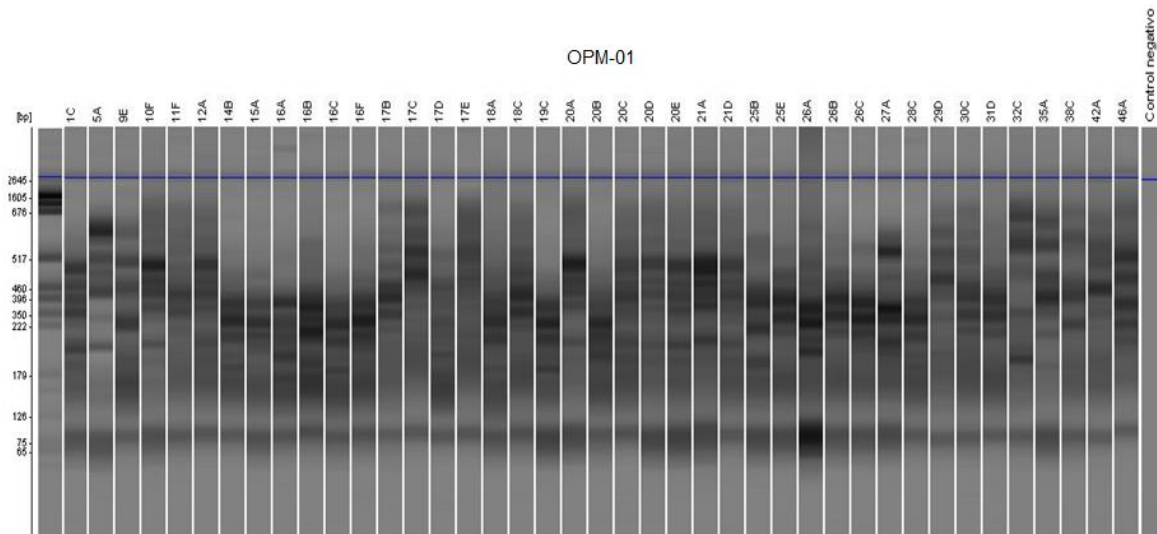


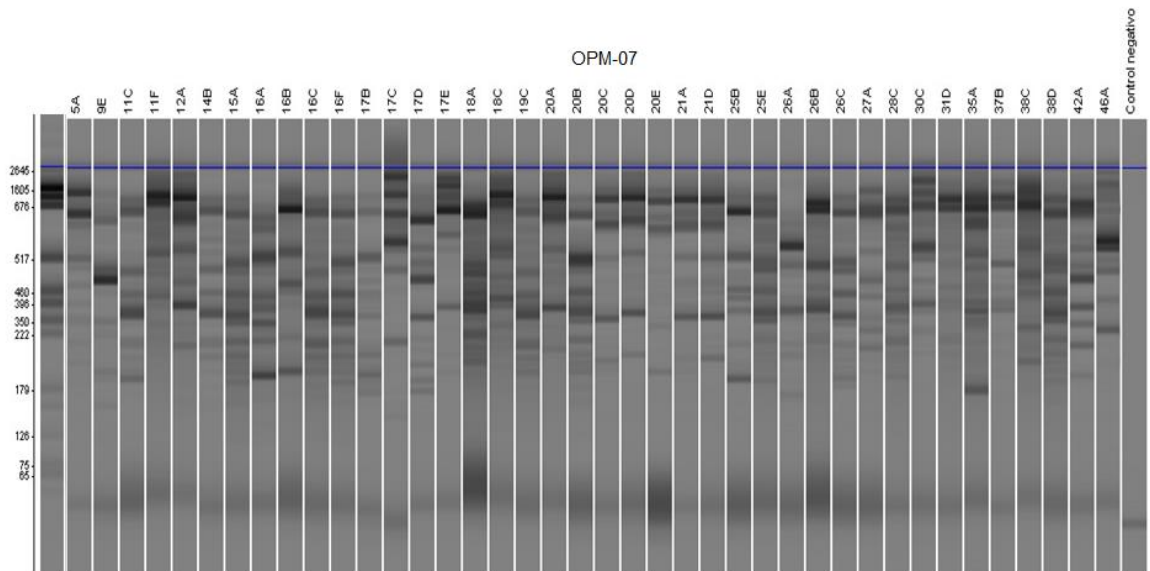
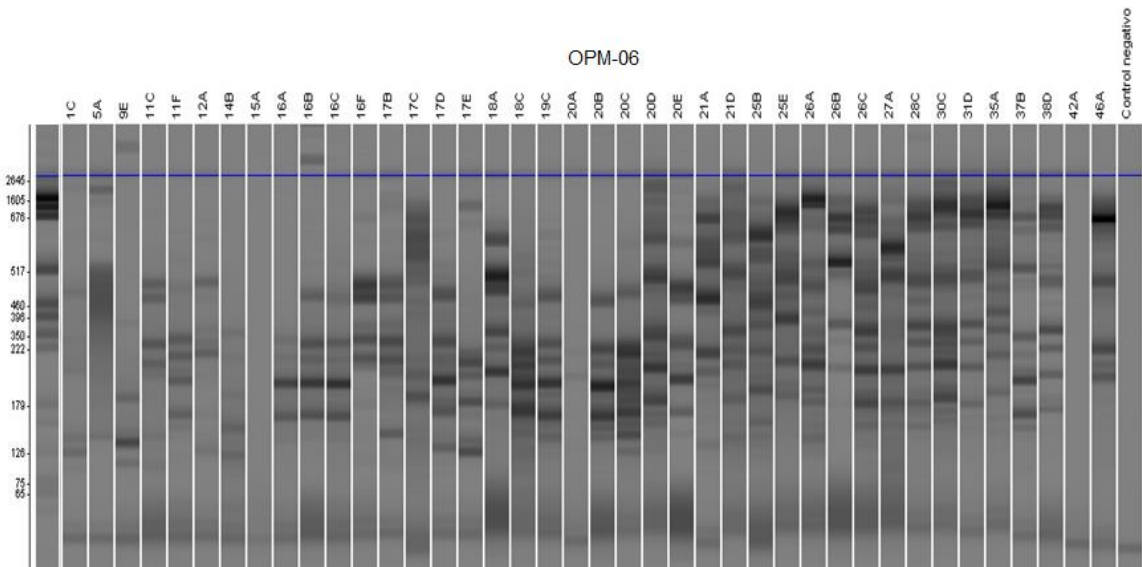
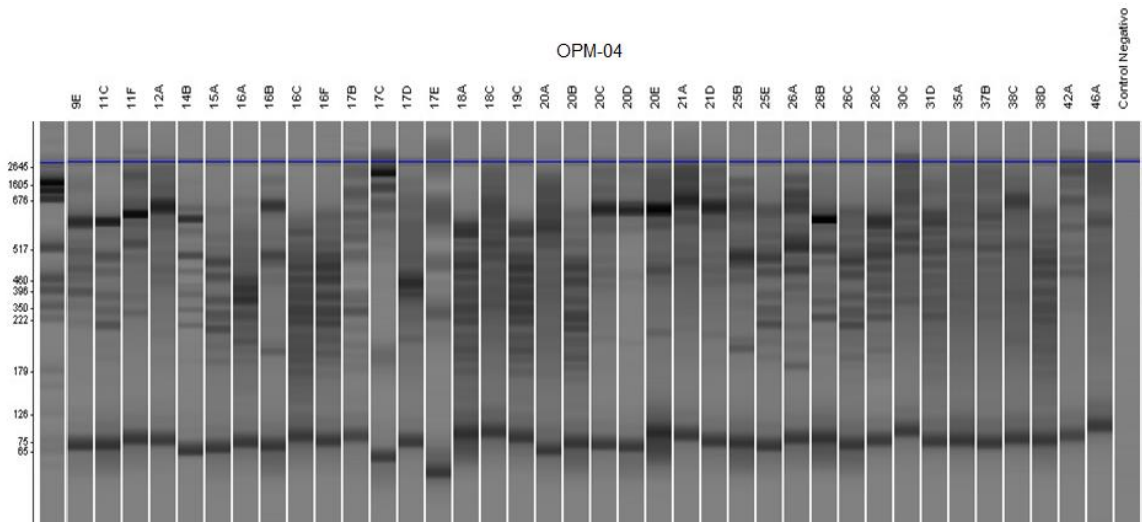


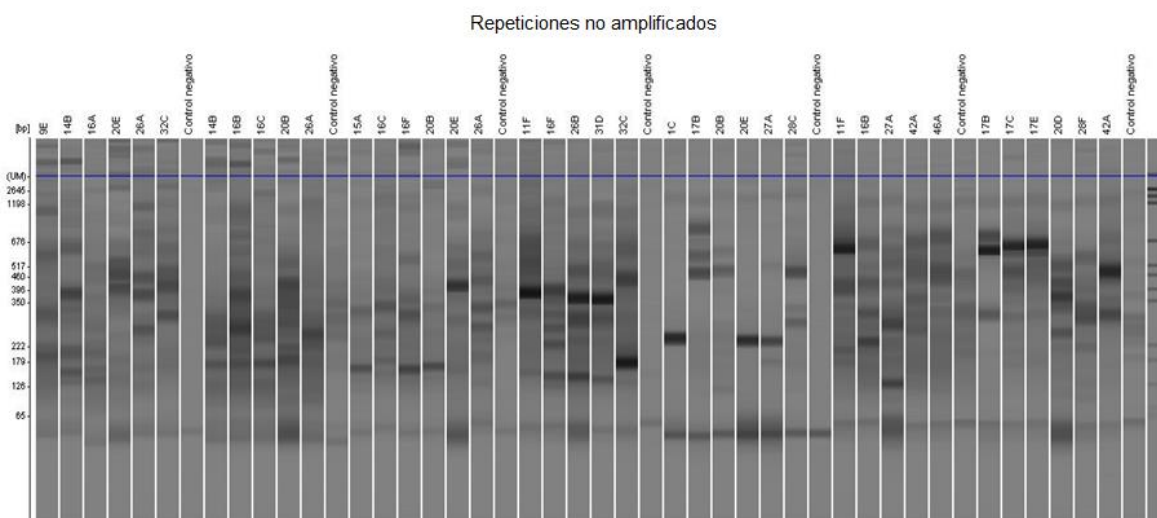
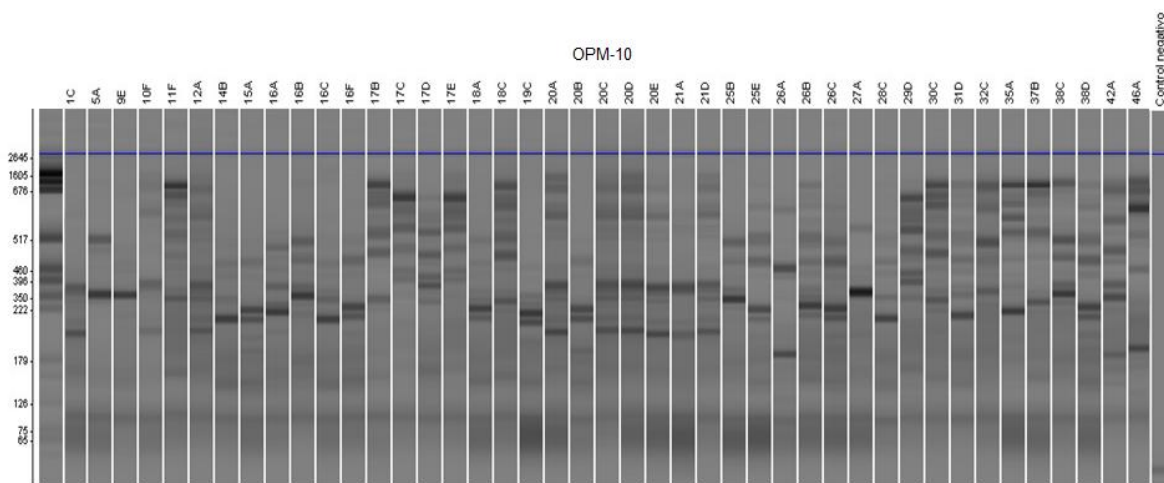
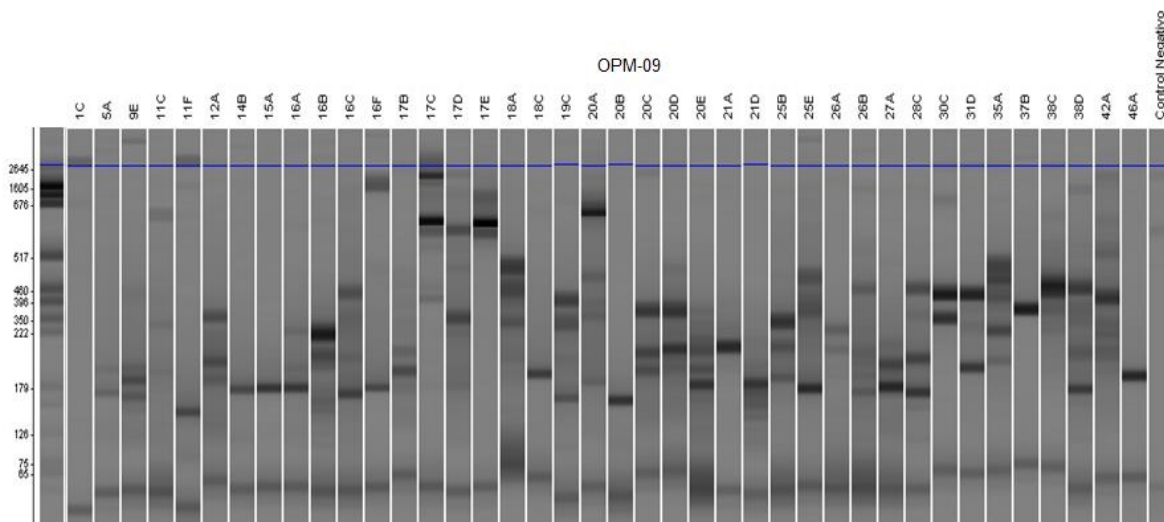
## F. Anexo: Huellas genéticas generadas a partir de las metodologías ap-PCR y DAF visualizadas en sistema de electroforesis por microchip











## G. Anexo: Calculo del porcentaje de área foliar de ñame afectada por el aislamiento DC 37B

Ensayo	Planta	Área foliar	Área foliar afectada	% de área foliar afectada	Ensayo	Planta	Área foliar	Área foliar afectada	% de área foliar afectada
E1	P1	31,91	0,198	0,62	E3	P2	17,380	0	0
E1	P1	35,266	0,479	1,36	E3	P3	41,498	0,888	2,14
E1	P1	22,940	0,204	0,89	E3	P3	45,641	0,305	0,67
E1	P2	32,075	0,779	2,43	E3	P3	38,237	1,976	5,17
E1	P2	27,828	0,481	1,73	E3	P3	38,914	0	0
E1	P2	18,321	0	0	E3	P3	29,592	0	0
E1	P3	3,799	0,04	1,05	E3	P4	16,192	0,455	2,81
E1	P3	15,875	0,123	0,78	E3	P4	45,882	0,219	0,48
E1	P3	23,944	0,531	2,22	E3	P4	45,641	0,305	0,67
E1	P3	12,914	0	0	E3	P4	37,518	0,352	0,94
E1	P4	5,523	0,034	0,63	E3	P4	43,075	1,567	3,64
E1	P4	8,694	0,036	0,42	E3	P4	27,828	0,203	0,73
E1	P4	4,148	0,010	0,25	E3	P4	36,296	0,304	0,84
E2	P1	27,296	1,619	5,93	E3	P4	42,507	0	0
E2	P1	27,951	0,943	3,37	E3	P4	44,137	0	0
E2	P1	51,425	0,082	0,16	E4	P1	9,644	0,0072	0,75
E2	P1	20,257	0,166	0,82	E4	P1	14,727	0,312	2,12
E2	P1	38,325	1,025	2,67	E4	P1	10,832	0,150	1,39
E2	P1	37,486	0,903	2,41	E4	P1	8,985	0	0
E2	P1	28,914	0	0	E4	P1	9,631	0	0
E2	P2	39,677	2,082	5,25	E4	P2	37,732	0,132	0,36
E2	P2	11,824	0,073	0,62	E4	P2	34,910	0,963	2,76
E2	P2	46,072	0,52	1,13	E4	P2	28,573	0,328	1,15
E2	P2	46,216	0,357	0,77	E4	P2	24,617	0,051	0,21
E2	P2	40,022	0,579	1,45	E4	P3	28,907	0,122	0,42
E2	P2	31,91	0,198	0,62	E4	P3	31,432	0,851	2,71
E2	P2	21,408	0,445	2,08	E4	P3	18,366	0	0
E2	P2	35,971	0	0	E4	P4	26,692	0,074	0,28
E2	P2	38,216	0	0	E4	P4	15,563	0,027	0,17
E2	P3	41,572	0,719	1,73	E4	P4	17,428	0	0
E2	P3	39,364	0,11	0,28	E5	P1	27,591	0,105	0,38
E2	P3	37,491	0,828	2,21	E5	P1	27,737	0,643	2,32

---

<b>E2</b>	<b>P3</b>	27,766	0,14	0,50	<b>E5</b>	<b>P1</b>	29,573	1,215	4,11
<b>E2</b>	<b>P3</b>	36,355	1,272	3,50	<b>E5</b>	<b>P1</b>	26,586	0	0
<b>E2</b>	<b>P3</b>	25,429	0	0	<b>E5</b>	<b>P1</b>	24,429	0	0
<b>E2</b>	<b>P3</b>	20,753	0	0	<b>E5</b>	<b>P2</b>	25,183	0,123	0,49
<b>E3</b>	<b>P1</b>	32,906	0,083	0,25	<b>E5</b>	<b>P2</b>	17,205	0,044	0,26
<b>E3</b>	<b>P1</b>	33,147	0,802	2,42	<b>E5</b>	<b>P2</b>	17,589	0,411	2,34
<b>E3</b>	<b>P1</b>	28,535	0,325	1,14	<b>E5</b>	<b>P2</b>	23,562	0,499	2,12
<b>E3</b>	<b>P1</b>	13,068	0	0	<b>E5</b>	<b>P3</b>	21,174	0,338	1,60
<b>E3</b>	<b>P2</b>	20,916	0,388	1,86	<b>E5</b>	<b>P3</b>	26,858	0,999	3,72
<b>E3</b>	<b>P2</b>	16,825	0,185	1,10	<b>E5</b>	<b>P3</b>	24,524	0	0
<b>E3</b>	<b>P2</b>	15,672	0,144	0,92	<b>E5</b>	<b>P3</b>	22,139	0	0





## Bibliografía

Abang, M., Fagbola, O., Smalla, K., Winter, S. 2005. Two Genetically Distinct Populations of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnosis in Yam. *Phytopathology* 153, 137-142.

Abang, M.M., Abraham, W.R., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G., Winter, S. 2009. Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycological research* 113, 130-140.

Abang, M.M., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G.S., Mignouna, H.D., Winter, S. 2006. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. *Journal of Phytopathology* 154, 51-61.

Abang, M.M., Hoffmann, P., Winter, S., Green, K.R., Wolf, G.S. 2004. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *Phytopathology* 152, 21-27.

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

Abang, M.M., Winter, S., Mignouna, H.D., Green, K.R., Asiedu, R. 2003. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology* 2, 486-496.

Aduramigba-Modupe, A.O., Asiedu, R., Odebode, A.C. 2008. Reaction of *Dioscorea alata* (water yam) to anthracnose disease in Nigeria. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 6, 248-252.

Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* Isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and Identification of a Unique Species from the Genus. *Ecology and Population Biology* 93, 579-587.

Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology* Fifth edition. Estados Unidos de América. Elsevier Academic Press.

Agronet (Red de Información y Comunicación Estratégica del Sector Agropecuario – Colombia). 2013.

[http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte16\\_2011.aspx?cod=16](http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte16_2011.aspx?cod=16). [Citado: 02/12/2013].

Alleyne, A.T. 2001. Characterization of Yam Anthracnose Phytotoxins and Population Genetics of *Colletotrichum gloeosporioides*. PhD thesis, University of the West Indies.

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 del Cauca. Fitopatología Colombiana 28.

Alvis, A., Vélez, C.A., Rada-Mendoza, M. 2008a. Composición de Ñames Frescos Cultivados en Colombia y Sometidos a Freído por Inmersión. 19, 3-10.

Alvis, A., Vélez, C.A., Villada, H.S., Rada-Mendoza, M. 2008b. Analisis fisico-químico y morfológico de almidones en ñame, yuca, papa y determinación de la viscosidad de pastas. Información Tecnológica 19, 19-28.

Amusa, N.A., Adegbite, A.A., Muhammed, S., Baiyewu, R.A. 2003. Yam diseases and its management in Nigeria. African Journal of Biotechnology 2, 497-502.

Amusa, N.A., Adegbite, A.A., Oladapo, M.O. 2005. Investigations into the role of weeds, soil and plant debris in the epidemiology of foliar fungal diseases of yam in western Nigeria. International Journal of Botany 1, 111-115.

Asiedu, R., Sartie, A. 2010. Crops that feed the World 1. Yams. Food Security 2, 305-315.

Ayodele, M.A., Hughes, J.d.A., Asiedu, R. 2004. Yam Anthracnose Disease: Field symptoms and laboratory diagnostic. In: Mahungu, N.M., Manyong, V.M. (Eds.), Proceedings of the Ninth Triennial Symposium jointly, Mombasa, Kenya. .

Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17, 221-242.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. Illustrated Genera of imperfect fungi. Minnesota, U.S.A: Burgess Publishing Company, 3ª Edition, p 126 y 200.

Barreto-Maciel, D., Vieira de Medeiros, L., Vieira de Medeiros, V., Carneiro-Leao, P., Aranha-Camargo, L.E., Tinti de Oliveira, N. 2010. Amplification of the cap20 pathogenicity gene and genetic characterization using different markers molecular in *Colletotrichum gloeosporioides* isolates. Brazilian Archives of Biology and Technology 53, 1255-1265.

Benítez-Camilo, F.A., Huerta-Palacios, G., Holguín-Meléndez, F., Toledo-Arreola, J. 2003. Efecto de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Saqcc. en la caída de frutos de mango (*Mangifera Indica* L.) CV. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21, 223-227.

Bently, S., Bassam, B.J. 1996. A Robust DNA Amplification Fingerprinting System Applied to Analysis of Genetic Variation Within *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Journal of Phytopathology 104, 207-213.

Botanical-Online. 2013. Cultivo del Ñame (*Dioscorea* spp.). [http://www.botanical-online.com/dioscorea\\_alata\\_cultivo.htm](http://www.botanical-online.com/dioscorea_alata_cultivo.htm). [Citado: 11/09/2013].

Bowen, J.K., Templeton, M.D., Sharrock, K.R., Crowhurst, R.N., Rikkerink, E.H. 1995. Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*: three strategies for the disruption of the pectin lyase gene *pnIA*. Molecular and General Genetics 196-205.

Brown, A.E., Sreenivasaprasad, S., Timmer, L.W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime antracnose strains of *Colletotrichum* from Citrus as *C. acutatum*. Molecular Plant Pathology 86.

Bustamante, S., Buitrago, G. 2006. Caracterización Molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando "Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci" (SAMPL) en condiciones radioactivas. Revista Colombiana de Biotecnología VIII, 60-66.

Bustamante, S., Guzmán, M., Buitrago, G. 2003. Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando "DNA Amplification Fingerprinting (DAF)" en condiciones radiactivas. Revista Colombiana de Biotecnología V, 57-63.

Caetano-Anolles, G., Bassam B.J. y Gresshoff P.M. 1991. DNA Amplification Fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 9, 553-557.

Caetano-Anolles, G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. Genome Research 3, 85-94.

Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. Studies in mycology 73, 181-213.

Cano, J., Guarro, J., Gene, J. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. Journal of clinical microbiology 42, 2450-2454.

Casarrubias-Carrillo, U., González-Chavira, M.M., Cruz-Hernández, A., Cárdenas-Soriano, E., Nieto-Angel, D., Guevara-González, R.G. 2003. Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. aislado de frutos de Papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. Revista Mexicana de Fitopatología 21, 338-345.

Cerón-Rincón, L.E., Higuera-M, B.L., Sánchez-N, J., Bustamante, S., Buitrago, G. 2006. Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* durante su cultivo en medios líquidos. Acta Biológica Colombiana 11, 99-109.

Chacón, A.G. 2005. Aclimatación de plántulas de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) producidas in vitro. Agronomía Costarricense 29.

Correa-Londoño, G., Lavalett-oñate, L.L., Galindo-Villardón, M.P., Afanador-Kafuri, L. 2007. Uso de métodos multivariantes para la agrupación de aislamientos de *Colletotrichum* spp. con base en características morfológicas y culturales. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 60, 3671-3690.

Cuellar, C. 2009. Caracterización molecular de hongos fitopatógenos aislados del cultivo del ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando DNA Amplification Fingerprinting (DAF). Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

Damm, U., Boroncelli, R., Cai, L., Kubo, Y., O'Connell, R., Weir, B., Yoshino, K., Cannon, P. 2010. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. IAM Fungus 1, 161-165.

Dean, R., Van kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-kosack, K. E., Pietro, A. D., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, J. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13, 414-430.

Dieguez-Uribeondo, J., Forster, H., Soto-Estrada, A., Adaskaveg, J.E. 2005. Subcuticular-Intracellular Hemibiotrophic and Intercellular Necrotrophic Development of *Colletotrichum acutatum* on Almond. Phytopathology 95, 751-758.

Domínguez-Guerrero, I.P., Mohali-Castillo, S.R., Marín-Montoya, M.A., Pino-Menesini, H.B. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. Tropical Plant Pathology 37, 108-122.

Egesi, C.N., Onyeka, T.J., Asiedu, R. 2007. Severity of anthracnose and virus diseases of water yam (*Dioscorea alata* L.) in Nigeria: Effects of yam genotype and date of planting. Crop Protection 26, 1259-1265.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2006. Fichas técnicas: Ñame (*Dioscorea trifida* L.). [en línea]. [http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/NAME.HTM](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/NAME.HTM). [Citado: 11/09/2013].

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. [Citado: 12/12/2013].

Freeman, S., Katan, T., 1997. Identification of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose and Root Necrosis of Strawberry in Israel. Phytopathology 87, 516-521.

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, 1014-1020.

Freeman, S., Rodríguez, R.J. 1995. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. Mycological research 99, 501-504.

Freeman, S., Shabi, E., Katan, T. 2000. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing Anthracnose of Anemone (*Anemone coronaria* L.). Applied and environmental microbiology 66, 5267-5272.

González-Vega, M.E. 2012. El Ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. Cultivos Tropicales 33, 5-15.

Hwang, C.S., Flaishman, M.A., Kolattukudy, P.E. 1995. Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. The Plant Cell 7, 183-193.

Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. 2009. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity 39, 147-182.

ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2009. Exportadores de ñame de la mano del ICA. <http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2009/Exportadores-de-name-de-la-mano-del-ICA.aspx>

Idnurm, A., Howlett, B.J. 2001. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. Molecular Plant Pathology 2, 241-255.

Khoo, G., Lim, T.M., Phang, V. 2011. A review of PCR-based DNA fingerprinting using Arbitrary Primers in tropical ornamental fishes of South-East Asia Journal of Advanced Medical Research 1, 71-93.

Kim, Y., Kawano, T., Li, D., Kolattukudy, E. 2000. A mitogen-activated protein kinase kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. The Plant Cell 12.

Kramer-Haimovich, H., Servi, E., Katan, T., Rollins, J., Okon, Y., Prusky, D. 2006. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on pelB activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. Applied and environmental microbiology 72, 1034-1039.

Lebot, V., Trilles, B., Noyer, J.L., Modesto, J. 1998. Genetic relationships between *Dioscorea alata* L. cultivars. Genetic Resources and Crop Evolution 45, 499-509.

Lee, Y.M., Choi, Y.K., Min, B.R. 2000. PCR-RFLP and sequence Analysis of the rDNA ITS Region in the *Fusarium* spp. The Journal of Microbiology 38, 66-73.

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

- Mehetre, P. 2013. Effect of various nitrogen sources and antagonists on the growth of *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler and Bisby causing anthracnose of yam (*Dioscorea alata* L.). International Journal of Plant Protection 6, 32-34.
- Mycobank. *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Link=T&TableKey=14682616000000063&Rec=33439&Fields=All>. [Citado: 19/09/2013].
- Mignouna, H.D., Abang, M.M., Asiedu, R. 2007. Yams. In: Kole, C. (Ed.), Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Pulse, Sugar and Tuber Crops.
- Mignouna, H.D., Abang, M.M., Asiedu, R. 2008. Chapter 23: Genomics of Yams, a common source of food and medicine in the tropics. Genomics of tropical crop plants Springer.
- Mignouna, H.D., Abang, M.M., Green, K.R., Asiedu, R. 2001. Inheritance of resistance in water yam (*Dioscorea alata*) to anthracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). Theoretical and Applied Genetics 103, 52-55.
- Montero-Tavera, V., Morales-García, J.L., González-Chavira, M.M., Anaya-López, J.L., Corona-Torres, T., Gálvez Mariscal, A. 2010. Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 1, 157-172.
- Montes, E., Salcedo, J., Zapata, J.E., Carmona, J., Paternina, S. 2008. Evaluación de las propiedades modificadas por vía enzimática del almidón de ñame (*D. trifida*) utilizando  $\alpha$ -amilasa (Termamyl 120 L, Tipo L.). Vitae: Revista de la facultad de química farmacéutica 15, 51-60.
- Morel, G, Wetmore R. 1951. Tissue culture of monocotyledons. American Journal of Botany 38, 138-140
- Munch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N., Deising, H.B. 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum species*. Journal of plant physiology 165, 41-51.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). Taxonomy Browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=474922>. [Citado: 11/09/2013].
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetics distances from a small number of individuals. Genetics 89, 583-590
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies Applied Biological Sciences 95, 2044-2049.
- Olivera, R., Moral, J., Bouhmidi, K., Trapero, A. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo. Boletín de Sanidad vegetal plagas 31, 531-548.

Padder, B.A., Sharma, P.N., Sharma, O.P., Kapoor, V. 2007. Genetic diversity and gene flow estimates among five populations of *Colletotrichum lindemuthianum* across Himachal Pradesh. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70, 8-12.

Pérez-Castro, L.M., Saquero, M.J., Beltrán- Herrera, J.D. 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología* V, 24-35.

Pérez-Martínez, M.E., Clavijo-Ponce, N. 2012. Experiencias u enfoques de procesos participativos de innovación en agricultura. El caso de la Corporación PBA en Colombia. Sub-división de Investigación y Extensión, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Pérez, J., Albert, D., Rosete, S., Sotolongo, L., Fernández, M., Delprete, P., Raz, L. 2005. Consideraciones etnobotánicas sobre el género *Dioscorea* (Dioscoreaceae) en Cuba. *Ecosistemas* 14, 142-149.

Photita, W., Taylor, P., Ford, R., Hyde, K., Lumyong, S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* 18, 117-133.

Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., Hyde, K.D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44, 33-43.

Pinzón-Gutiérrez, Y.A., Bustamante, S.L., Buitrago, G. 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología* XI, 8-18.

Pinzón-Gutiérrez, Y.A., Bustamante, S.L., Buitrago, G.H. 2013. Diagnóstico molecular diferencial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología* XV, 52-60.

Prusky, D., McEvoy, J.L., Leverentz, B., Conway, W.S. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *The American Phytopathological Society* 14, 1105-1113.

Reina-Aranza, Y.C. 2012. El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Documentos de trabajo sobre economía regional. Banco de la República.

Ripoche, A., Jacqua, G., Bussièrre, F., Guyader, S., Sierra, J. 2008. Survival of *Colletotrichum gloeosporioides* (causal agent of yam Anthracnose) on yam residues decomposing in soil. *Applied Soil Ecology* 38, 270-278.

Rivera-Jiménez, H., Álvarez, A., Palacio-Mejía, J., Ochoa, A. 2012. Caracterización molecular de accesiones de ñame (*Dioscorea alata* L.) de la región Caribe colombiana. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica* 15, 323-330.

- Rodriguez-González, A.F. 2007. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- Rodriguez, W. 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana* 11, 133-152.
- Saldarriaga-Cardona, A., Castaño-Zapata, J., Arango-Isaza, R. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Revista Académica Colombiana de Ciencia* XXXII, 145-156.
- Sanabria, A., Mahuku, J., Kelemu, S., Cadavid, M., García, C., Hío, J.C., Martínez, E., Osorio, J. 2010. Molecular identification and characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from Tahiti lime, tamarillo, and mango. *Agronomía Colombiana* 28, 391-399.
- Sánchez-Vesga, C., Hernández-Vásquez. 1998. Descripción de aspectos productivos, de poscosecha y de comercialización del ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar., Resultados de la Investigación Agrícola en la Región del Caribe. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Bogotá, Colombia, pp. 53-65.
- Sautour, M., Mitaine-Offer, A.C., Miyamoto, T., Dongno, A., Lacaille-Dubois, M.A. 2004. Antifungal steroids saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Planta Médica* 70, 90-92.
- Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50, 205-221.
- Shen, S., Goodwin, P.H., Hsiang, T. 2001. Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum*, causing anthracnose of tobacco. *Mycological research* 105, 1340-1347.
- Shih, J., Wei, Y., Goodwin, P.H. 2000. A comparison of the pectate lyase genes, pel-1 and pel-2, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. malvae and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *GENE An International Journal on Genes and Genomes* 243, 139-150.
- Soo, B.P., Young, J.L., Jung, H.L., Ki, S.H., Sun, C.L., Chang, K.S., Jin, H.K., Dong, W.B., Dong, K.K., Hee, K.K. 2004. Developing polyclonal antibody-based indirect-ELISA to detect Antracnose inocula prior to soybean sprout rot. *Plant Pathology* 20, 252-257.
- Sreenivasaprasad, S., Meehan, B.M., Mills, P.R., Brown, A.E. 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome Research* 39, 499-512
- Stephenson, S.A., Hatfield, u., A. G., Maclean, D.J., Manners, J.M. 2000. CgDN3: An essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Phytopathological Society* 13, 929-941.



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

Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., Oliveira, H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and environmental microbiology* 71, 2987-2998.

Tejada-Benítez, L.P., Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortíz, A., Tarón dunoyer, A., Barrios-Mindiola, B., Tejada-Benítez, L.M. 2007. Aprovechamiento del ñame espino (*Dioscorea rotundata*) en la producción de bioplásticos. *Prospectiva* 5, 68-74.

Than, P.P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P.W., Hyde, K.D. 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 9, 764-778.

Twumasi, J.K. 1986. Fungi associated with the tar spot disease of water yam (*Dioscorea alata* L.) in Ghana. *Ghana Journals Agriculture Science* 14, 115-119.

USDA - Agricultural Research Service United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference, Basic Report: 11601, Yam, raw. [en línea]. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3313?fg=&man=&facet=&format=&count=&max=25&offset=&sort=&qlookup=yam>. [Citado: 11/09/2013].

Valadez E., Kahl G. 2000. Huellas de ADN de genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Ediciones Mundi-Prensa. México, pp.147.

Vidal-Tovar, C.R. 2010. El ñame espino (*Dioscorea rotundata* Poir.): una opción en la producción de jarabes edulcorantes intermedios para la industria alimentaria. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 1, 19-28.

Weir, B.S., Johnston, P.R., Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology* 73, 115-180.

Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218.

Wharton, P., Diéguez-Uribeondo, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61, 3-22.

Yakoby, N., Beno-Moualem, D., Kenn, N.T., Dinoor, A., Pines, O., Prusky, D. 2001. *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit-gungus interaction.pdf>. *The American Phytopathological Society* 14, 988-995.

Yakoby, N., Kobiler, I., Dinoor, A., Prusky, D. 2000. pH Regulation of Pectate Lyase Secretion Modulates the Attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on Avocado Fruits. *Applied and environmental microbiology* 66, 1026-1030.

Yang, Y.L., Liu, Z.Y., Cai, L., Hyde, K.D., Yu, Z.N., McKenzie, E.H.C. 2009. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. Fungal Diversity 39, 123-146.