



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Identificación de especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a la Antracnosis de tres núcleos productivos de Caucho Natural en Colombia**

**Yudy Alejandra Guevara Castro**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Postgrado Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2017

**Identificación de especies de *Colletotrichum* spp.  
asociadas a la Antracnosis de tres núcleos productivos  
de Caucho Natural en Colombia**

**Yudy Alejandra Guevara Castro**

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

**Magister en Microbiología**

Director

Ph.D Aníbal L. Tapiero

Codirector

Ph.D Fabio A. Aristizabal

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

2017

*A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.*

*A Mis padres por su amor, apoyo incondicional, por luchar y creer en mi, por brindarme las herramientas para forjar mi futuro, todo esto se lo debo a ustedes. Los amo.*

*A Mis abuelos Esther Teatino y Gonzalo Castro “mi Pluma blanca” (QEPD, te extraño), por quererme, apoyarme y alcahuetearme siempre, esto también es por ustedes.*

## Agradecimientos

A Dios y a la vida por trazar para mí un plan de vida colmado de bendiciones, lleno de experiencias llenas de aprendizaje, y rodeado de personas maravillosas.

A mi Director Anibal L. Tapiero por su acertado consejo y aporte a mi formación, 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 mi Codirector Fabio Aristizabal por su empeño constante en apoyar mi formación Académica.

A todos los miembros de Corpoica C.I. La Libertad, a quienes considero mi familia y siempre alegraron mis días de quehacer. A Ruben Valencia, por darme la oportunidad de estudiar y formarme académicamente. A Marcela Lopez, Ferney Lopez, Carolina Pisco, Andrea Mayorga y Jenny Diaz, por ser incondicionales.

A mis padres por su amor, confianza y apoyo constante durante el transcurso de mi vida y formación académica. A mi familia por apoyar constantemente mis decisiones, acompañar mis triunfos y alentar mi espíritu en momentos de fracaso.

A la Maestría en Ciencias Microbiología, por atesorar conocimiento en las nuevas generaciones. A Socorrito por acompañar y asesorar de la mano mi proceso de formación.

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

## Resumen

El Caucho Natural, producto del árbol de Caucho (*Hevea brasiliensis*), fue identificado a comienzos de siglo dentro de la apuesta exportadora de Colombia, por lo que las áreas cultivadas se incrementaron vertiginosamente entre el 2005 y 2015 como respuesta a una anhelada creciente demanda mundial e interna para la industria manufacturera. Producto de la combinación de diferentes factores epidemiológicos, los cultivos de caucho en las nuevas áreas vienen siendo afectados por un incremento en las afecciones ocasionadas por el organismo patógeno *Colletotrichum* spp., hongo Ascomyceto, agente causal de la Antracnosis y la caída secundaria de las hojas, con la consecuente pérdida de área foliar e incremento en los costos de manejo del cultivo (Tapiero, 2013).

A pesar de la dispersión generalizada y en ausencia de conocimiento al respecto de la estructura poblacional específica responsable de la composición de especies que causan infección en los diferentes núcleos productivos de Colombia, se propuso caracterizar a nivel de especie 40 aislamientos de *Colletotrichum* spp. adquiridos de lesiones sobre clones susceptibles y de diferente procedencia (llanos orientales, piedemonte amazónico y zona marginal cafetera). En consecuencia, se determinaron las características morfológicas de la colonia del hongo, tales como color, y tasa de crecimiento; y se determinó la presencia de acérvulos, forma y tamaño de conidias y apresorios. Se realizó la caracterización molecular mediante el uso de cebadores específicos para la determinación de complejos de especies de *Colletotrichum*, *CgInt-ITS4* para *C. gloeosporioides*, *CaInt2-ITS4* para *C. acutatum* y *Col1-ITS4* para *C. boninense*. Adicionalmente se amplificaron y secuenciaron, las regiones ITS-ADNr y los genes informativos *GAPDH* y *TUB2* para en conjunto someter esta información a un análisis filogenético por complejo de especies.

Finalmente, se realizaron pruebas de patogenicidad con los aislamientos origen de la caracterización con el objeto de confirmar la evidencia de la causalidad mediante la reproducción de los síntomas característicos de la enfermedad y los signos del patógeno. De esta manera se obtuvo que la composición poblacional del patógeno está compuesta por 10 especies con relaciones filogenéticas a nivel de 3 complejos de especies; *C. siamense*, *C. frutícola*, *C. aeshynomenes*, *C. tropicale* y *C. gloeosporioides* del complejo *C. gloeosporioides*; *C. laticiphilum*, *C. orchidophilum*, *C. paxtonii* y *C. limeticola* del Complejo *C. acutatum*; y del complejo *C. boninense* la especie *C. boninense*.

**Palabras clave:** Antracnosis, Análisis filogenético, *Colletotrichum* spp., *Hevea brasiliensis*.

## Abstract

Natural Rubber, product of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), was identified at the beginning of the century within the exporting bid of Colombia, reason why the cultivated areas increased vertiginously between 2005 and 2015 in response to a desired global demand and internal for the manufacturing industry. As a result of the combination of several epidemiological factors, different plant organs have been experiencing an increase in the symptoms of Antracnoses, descendent death and Secondary Falling Leaves (SFL), resulting in the loss of foliar area and the increment of crops management costs.

Aiming to know the specific composition of the pathogen, isolates of *Colletotrichum* have been differentiated by origin (clone) and source (llanos orientales, piedemonte amazónico and zona marginal cafetera). These isolates were characterized morphologically by colony color, and growth rate; and the presence of acérvulos, shape and size of conidia and appressoria were determined. Molecular characterization was performed by using specific primers for the determination of complexes of *Colletotrichum* species, CgInt-ITS4 for *C. gloeosporioides*, Calnt2-ITS4 for *C. acutatum* and Col1-ITS4 for *C. boninense*. Bayesian inference phylogenetic analysis was conducted after amplifying and sequencing the ITS-ADNr regions with the primers of the informative genes *GAPDH* and *TUB2*. Finally, pathogenicity tests were carried out with the isolations originating from the characterization in order to confirm the evidence of the causality by reproducing the characteristic symptoms of the disease and the signs of the pathogen.

The morphological characters were indifferent to the analyzed species, but their belonging to *Colletotrichum* was corroborated. The phylogenetic analysis identified 10 species, *C. siamense*, *C. frutícola*, *C. aeshynomenes*, *C. tropicale* and *C. gloeosporioides* for complex *C. gloeosporioides*; *C. laticiphilum*, *C. orchidophilum*, *C. paxtonii* and *C. limetticola* for complex *C. acutatum*; and for the complex *C. boninense*, the specie *C. boninense*.

**Keywords:** Antracnoses, *Colletotrichum* spp., *Hevea brasiliensis*, Phylogenetic Analysis.







2.2 Aislamiento y purificación de aislamientos del hongo.....	31
2.3 Cultivos monospóricos.....	33
2.4 Caracterización morfológica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	34
2.5 Identificación molecular de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	35
2.5.1 Extracción de ADN.....	35
2.5.2 Identificación a nivel de complejo de especies con primers específicos.....	36
2.5.3 Filogenia de especies de <i>Colletotrichum</i> spp.....	37
2.6 Pruebas de Patogenicidad.....	38
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>42</b>
3.1 Obtención de Aislamientos .....	42
3.2 Caracterización morfológica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	42
3.3 Identificación molecular de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	47
3.3.1 Identificación a nivel de complejo de especies con cebadores específicos.....	47
3.3.2 Filogenia de especies de <i>Colletotrichum</i> spp.....	50
3.3.2.1 Complejo de especies <i>C. gloeosporioides</i> .....	51
3.3.2.2 Complejo de especies <i>C. acutatum</i> .....	55
3.3.2.3 Complejo de especies <i>C. boninense</i> .....	58
3.3.3 Pruebas de Patogenicidad.....	61
4. <b>Conclusiones.....</b>	<b>66</b>
5. <b>Recomendaciones.....</b>	<b>68</b>
6. <b>Productos generados.....</b>	<b>69</b>
A. Anexos.....	70
<b>Bibliografía.....</b>	<b>80</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1.</b> Ciclo de vida general para especies de <i>Colletotrichum</i> (Silva et al., 2017).....	25
<b>Figura 1-2. Estrategias de colonización adoptadas por especies de <i>Colletotrichum</i>.</b> A. Hemibiotrofia Intracelular. B. Necrotrofia subcicular intramular. C. Infección hemibiotrófica localizada con hifa primaria multilobulada. D. Hemibiotrofia extendida. C: Conidia, AP: Apresorio, E: Célula Epidérmica, M: Células Mesófilas, PH: Hifa primaria, SE: Hifa Secundaria, MLPH: Hifa primaria multilobulada (De Silva et al., 2017).....	8
<b>Figura 2-1.</b> Puntos de muestreo foliar en plantaciones de Caucho Natural ( <i>Hevea brasiliensis</i> ).....	26
<b>Figura 2-2.</b> Puntos de muestreo departamental en plantaciones comerciales de Caucho Natural ( <i>Hevea brasiliensis</i> ).....	32
<b>Figura 3-1.</b> Dendograma construido por el método UPGMA a partir del coeficiente de similaridad de Gower de las variables morfológicas evaluadas en la colección de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. de Caucho natural.....	33
<b>Figura 3-2.</b> Complejos de especies de <i>Colletotrichum</i> spp. asociadas a la Antracnosis del Caucho Natural ( <i>Hevea brasiliensis</i> ) para tres núcleos productivos de Colombia.....	44
<b>Figura 3-3.</b> Árbol filogenético consenso basado en inferencia bayesiana, ilustrando la relación entre los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> en el complejo de especies “ <i>gloeosporioides</i> ”. El árbol fue construido usando secuencias concatenadas de la región completa del ITS-ADNr y los genes <i>GDPH</i> y <i>TUB2</i> . <i>Colletotrichum acutatum</i> (CBS112996) fue usado como Outgroup. Los números presentes en cada clado representan las probabilidades posteriores.....	49

**Figura 3-4.** Árbol filogenético consenso basado en inferencia bayesiana, ilustrando la relación entre los aislamientos de *Colletotrichum* en el complejo de especies “*acutatum*”. El árbol fue construido usando secuencias concatenadas de la región completa del ITS-ADNr y los genes *GDPH* y *TUB2*. *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS 112999) fue usado como Outgroup. Los números presentes en cada clado representan las probabilidades

posteriores.....53

**Figura 3-5.** Árbol filogenético consenso basado en inferencia bayesiana, ilustrando la relación entre los aislamientos de *Colletotrichum* en el complejo de especies “*boninense*”. El árbol fue construido usando secuencias concatenadas de la región completa del ITS-ADNr y los genes *GDPH* y *TUB2*. *Colletotrichum glosporioides* (CBS 112999) fue usado como Outgroup. Los números presentes en cada clado representan las probabilidades

posteriores.....56

**Figura 3-6.** Especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis del Caucho Natural (*Hevea brasiliensis*) para tres núcleos productivos de Colombia.....59

**Figura 3-7.** Dendograma construido por el método UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Gower de las variables de desarrollo de la enfermedad en complejos de especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis del Caucho Natural.....60

**Figura 3-8.** Dendograma construido por el método UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Gower de las variables de desarrollo de la enfermedad de especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis del Caucho Natural.....62

**Figura 3-9.** Progreso de la enfermedad en pruebas de patogenicidad para la especie *C. siamense*. A. Control, B. Aparición de síntomas, 4 días, C. Síntomas, 5 días, D. Signos del patógeno, 8 días.....63

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 2-1.</b> Descripción de unidades taxonómicas operacionales de <i>Colletotrichum</i> spp. empleadas para los análisis filogenéticos.....	39
<b>Tabla 3-1.</b> Descripción de las categorías morfológicas empleadas en la caracterización de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. en Caucho.....	43
<b>Tabla 3-2.</b> Características de los morfotipos discriminados mediante coeficiente de similaridad de Gower.....	45
<b>Tabla 3-4.</b> Características de los patotipos discriminados mediante coeficiente de similaridad de Gower.....	46

## Lista de Símbolos

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>
uL	Microlitro
uM	Micromolar
cm	Centímetros
g	Gramos
h	Hora
ha	Hectarea
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
ppm	Partes por millon
s	Segundo
L	Litro

## Introducción

El árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*) es originario de la zona ecuatorial de Suramérica. Su dispersión natural ocurre principalmente en la gran cuenca del río Amazonas, cubriendo un amplio territorio ocupado en la actualidad por Brasil, Bolivia, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia (Gasparotto et al., 1997). Actualmente, la producción mundial es ligeramente superior a la demanda en el mercado internacional (CCC, 2015), y se concentra en Asia con un 93%, siendo Indonesia (33%), Tailandia (22%), y Malasia (12%) los líderes mundiales, seguidos por los países Africanos (5%) y América Latina (2%) (CCC, 2015). En Colombia, el número de hectáreas sembradas en caucho natural (*Hevea brasiliensis*) es marginal con respecto al potencial productivo del país. Los cálculos más conservadores estiman en cerca de 263.000 ha el área óptima para el establecimiento de plantaciones de caucho, área que puede ser de hasta 900.000 ha si se incluyen zonas con algún tipo de restricciones para ser consideradas de “escape” al Mal Suramericano de las Hojas (por sus siglas en inglés SALB), principal enfermedad del Caucho Natural (CONIF, 1997).

Colombia cuenta con aproximadamente 52.221,7 hectáreas, de las cuales el departamento de Meta contribuye con 18.498,3 hectáreas, seguido por los departamentos de Vichada (9.850,3 ha), Santander (7.923,9 ha), Caquetá (4.471,9 ha) y Antioquia (3.755,9 ha). Existen aproximadamente 3.178,1 hectáreas en producción y 47.047,1 hectáreas en sostenimiento (CCC, 2015). Los departamentos con mayor área en producción son, Caquetá con 1.172,3 hectáreas, seguido por Meta, Santander, Caldas y Antioquia, sumando 1.632,3 hectáreas. Los departamentos que tienen la mayor área en etapa de sostenimiento son Meta, Vichada y Santander, con 34.310,6 hectáreas, las cuales de acuerdo a los datos de siembras serían potenciales para entrar a etapa productiva los próximos años (CCC, 2015). El caucho natural se encuentra dentro de la apuesta exportadora de Colombia por lo que las áreas cultivadas se incrementaron vertiginosamente entre el 2005 y 2015 como respuesta a una anhelada creciente demanda mundial e interna para la industria manufacturera. Producto de la combinación de diferentes factores epidemiológicos, las plantaciones en la mayoría de las áreas ha venido siendo afectada por un incremento en la afección de *Colletotrichum* spp. agente

causal de la Antracnosis y la caída de las hojas CLF por sus siglas en inglés (*Colletotrichum* Leaf Fall), ocasionando pérdidas de área foliar e incremento en los costos de producción derivados de su manejo (Tapiero, 2013). El desarrollo de la situación se relaciona directamente con las condiciones del ambiente, particularmente por efectos de la coincidencia de estados foliares receptivos (A-C) durante el desarrollo de plantas, con épocas de alta humedad relativa y presencia del inóculo de *Colletotrichum* spp. La intermitencia en la frecuencia de las precipitaciones derivadas de efectos moduladores del clima, el incremento de la temperatura, la transformación del paisaje con la expansión de la frontera agrícola, la proximidad de áreas de cultivo con predios desatendidos (Tapiero 2013), la resistencia del patógeno al control químico inadecuado y el desconocimiento de la composición de especies de *Colletotrichum*, han venido afectando el cultivo, particularmente provisto de una base genética reducida por la que han optado la mayoría de los agricultores de Caucho Natural a nivel nacional.

La antracnosis conocida desde 1905, fue inicialmente atribuida al ascomiceto *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. in Penz, y actualmente es asociada a un colectivo de especies con morfología y patogenicidad variable en un amplio rango de hospederos (Damm et al, 2012; Weir, 2012). La plasticidad fenotípica, preferencia por el hospedero y estilo de vida clasificado ampliamente como necrótrofo, hemiibiótrofo, quiescente y endófito (De Silva et al., 2017; Sreenivasaprasad et al., 2005), han sido criterios empleados para la identificación de especies de *Colletotrichum* además de proporcionar información útil sobre las interacciones planta-patógeno. Actualmente no se conocen especies de *Colletotrichum* estrictamente saprofitas y algunas especies endófitas pueden convertirse en patógenas (Freeman & Rodríguez, 1993; Zabalgoceazcoa, 2008). Los cambios fisiológicos, bioquímicos y ambientales de la interacción hospedero-patógeno pueden activar diferentes vías de transducción de señales defensivas relacionadas con las respuestas tanto del hospedero como del patógeno, importantes para mantener o facilitar la transición de “estilos de vida” o estrategias de invasión del organismo causal (Lu et al., 2004; Liu et al., 2007; Joshee et al., 2009; Prusky et al., 2013; Rojas et al., 2010; Yuan et al., 2011). La caracterización del agente etiológico de una enfermedad es fundamental para la comprensión de patosistemas en procura de alternativas de manejo. La evaluación de síntomas y signos,

técnicas de microscopía, determinación de la patogenicidad, y análisis moleculares, permiten la identificación polifásica de un patógeno (Putnam, 1995). En consecuencia, para el control efectivo de la enfermedad se requiere del desarrollo de técnicas que permitan mayor rapidez y confiabilidad en la identificación (Ward et al., 2004). El presente trabajo se orientó a la identificación de especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis de tres núcleos productivos de Caucho Natural en Colombia, para el desarrollo de diagnósticos mejorados y la aplicación de métodos integrados de control a la enfermedad que mitiguen la incursión de otras especies exóticas.



# Objetivos

## Objetivo General

Identificar las especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis de tres núcleos productivos de Caucho Natural en Colombia.

## Objetivos Específicos

- Caracterizar morfológicamente aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos a partir de plantaciones comerciales de Caucho Natural con síntomas de Antracnosis.
- Identificar molecularmente los complejos y especies de *Colletotrichum* asociados a la antracnosis del Caucho Natural en plantaciones comerciales de Colombia.
- Realizar pruebas de patogenicidad para la determinación de especies de *Colletotrichum* causales de antracnosis en plantaciones comerciales de Caucho Natural.

# 1. Estado del Arte

## 1.1 Descripción de la planta

El caucho es una planta que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, todas sus especies son arbóreas y leñosas. Sus raíces son pivotantes de gran longitud, ubicadas en los primeros 80 centímetros de profundidad. El tallo es vertical, cilíndrico y levemente dilatado en la base. Las hojas son reclinadas, trifoliadas con peciolo largos, en estados jóvenes son de color cobrizo, pasando a un verde claro brillante y en su madurez, son de color verde oscuro (Gasparotto *et al.*, 1997; Gonçalves *et al.*, 2001). Las flores, masculinas y femeninas, se encuentran agrupadas en una inflorescencia que tiene forma de racimo y color amarillo claro. El fruto es una capsula dehiscente, de tres celdas, con una semilla en cada una de ellas; y la semilla tiene forma redondeada, su epidermis presenta manchas oscuras sobre un fondo más claro, regularmente de color café o marrón (Gasparotto *et al.*, 1997).

El crecimiento del árbol de caucho es rítmico hasta los 3 años, durante este período las fases de crecimiento se alternan con épocas de dormancia, por lo cual el árbol crece mediante una sucesión de lanzamientos foliares, dependientes de factores genéticos y ambientales (Guyot *et al.*, 2001). Las plantas de caucho presentan un período anual de defoliación a partir del tercer o cuarto año, generalmente al inicio de la estación seca, seguido de un flujo uniforme de brotaciones. La duración, intensidad y velocidad de ese período de renovación foliar varía de clon a clon (Furtado, 1996) y según las condiciones ambientales, cuánto más rápido y pronunciado sea el decrecimiento de las lluvias, más rápida y uniforme es la senescencia y caída de las hojas (Gasparotto *et al.*, 1997). La fase de establecimiento o período improductivo del cultivo se presenta durante los primeros 5 años, dependiendo del genotipo. Al finalizar este periodo, se inicia la fase productiva y colecta de látex hasta por 30 años, no obstante, el rendimiento puede declinar gradualmente con la edad de la planta. Finalizada la etapa de extracción del látex, los arboles pueden ser fuente maderas haciendo del cultivo en un sistema de doble propósito (Corley, 1983).

### 1.1.1 Ontogenia Foliar

Los ciclos de la ontogenia foliar comprenden cuatro fases relacionadas con el nivel de actividad del meristemo apical y con las etapas de desarrollo foliar. La fase A comprende la formación de primordios foliares y de yemas axilares, dura en promedio nueve días; la fase B es la de elongación inicial, tiene una duración media de 10 días y presenta dos etapas: B1, donde los folíolos tienen una alta concentración de antocianina y están en posición vertical con el ápice hacia arriba y B2, donde los ápices de los folíolos se voltean hacia abajo y presentan coloración antociánica menos intensa; en la fase C los folíolos son flácidos y de color verde, dura aproximadamente ocho días; la fase D, donde se da la dormancia de la yema apical cuando las hojas están totalmente desarrolladas, normalmente dura 13 días. Los hongos son los principales agentes causales de enfermedades de importancia económica en el cultivo de caucho, siendo los responsables de casi el 100% de los casos (Gasparotto *et al.*, 1997, Gasparotto *et al.*, 2012). Los estadios foliares son importantes en las relaciones patógeno-hospedero, debido a que pueden interactuar con las etapas de desarrollo de los patógenos; en el caso del caucho, las hojas jóvenes son el tejido receptivo y las hojas adultas son más tolerantes. Para *H. brasiliensis*, el estado A-C es susceptible a la infección por patógenos foliares como *Colletotrichum* spp. y *Microcyclus ulei*; en la fase D se presenta resistencia general a la penetración de hongos (Sambugaro, 2007).

## 1.2 Usos del Caucho Natural

El caucho natural [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss.) Muell.-Arg.], es el producto comercial de una especie forestal caducifolia [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss.) Muell.-Arg.] cuya principal fuente de aprovechamiento es la producción de látex utilizado como materia prima en diferentes sectores industriales (Compagnon, 1998). Con él se fabrican llantas y neumáticos de automotores, guantes quirúrgicos y de aseo, mangueras, empaques para automotores, condones, bandas transportadoras, suelas de calzado, productos comestibles, pegantes, borradores, cubiertas aislantes de electricidad, pinturas y lacas. Según datos avalados, el 67% del caucho natural es utilizado para la producción de llantas, el 11% en guantes y productos que requieren látex centrifugado y el 22% en otros artículos (MADR, 2009). Adicionalmente, se ha reportado que la semilla del caucho contiene aceites con los que se produce pinturas y

barnices; su pulpa es utilizada para alimento animal, y la madera resultante al final de su etapa productiva, es muy apropiada para la fabricación de enchapes y muebles de alta calidad (Mejía, 2010; CIRAD, 2001).

### 1.3 Antracnosis

La palabra antracnosis derivada del griego anthrax “carbón” significa ennegrecimiento y con ella se denomina al grupo de enfermedades que atacan el follaje, los tallos y los frutos, desencadenando síntomas con manchas oscuras o lesiones sumidas de borde elevado (Agrios, 2005). Esta enfermedad es considerada de amplio espectro, ya que afecta un sin número de hospederos, cereales, pastos, legumbres, vegetales, ornamentales y cultivos perennes, incluidos los árboles frutales (cítricos), pino y caucho (Afanador-Kafuri et al., 2003; Furtado y Trindade, 2005; Agrios, 2005; Talhinhos et al., 2005; Damm et al., 2012; Weir et al., 2012).

La antracnosis en Caucho fue reportada en 1906 en Sri Lanka y posteriormente en Malasia, donde fue reconocida como *Gloesporium leaf disease* (Wastie, 1973). En Brasil tiene una amplia dispersión en la región Norte afectando ocasionalmente plantas de caucho en todas las fases del cultivo, mientras que en la región sudeste se ha presentado con evidente severidad, principalmente en São Paulo, Minas Gerais y Espírito Santo (Furtado et al., 2005).

En Colombia el caucho natural se encuentra dentro de la apuesta exportadora y las áreas cultivadas se han incrementado vertiginosamente como respuesta a una creciente demanda mundial e interna para la industria manufacturera. Producto de la combinación de diferentes factores epidemiológicos, la base genética utilizada para la siembra de las nuevas áreas ha venido siendo afectada por un incremento en la afección de la Antracnosis y la caída secundaria de las hojas por sus siglas en inglés CLF (Secondary Leaf Fall) (Tapiero, 2013), ocasionando pérdidas de área foliar al afectar el proceso fotosintético y de asimilados necesarios para la síntesis del látex (Saha et al., 2002; Gasaroto et al. 2012), incrementando los costos de producción derivados de su manejo.

El desarrollo de la situación se relaciona directamente con las condiciones del ambiente, particularmente por efectos de la coincidencia de estados foliares receptivos (A-C) durante el desarrollo de plantas, con épocas de alta humedad relativa y presencia de inóculo del

patógeno. La intermitencia en la frecuencia de las precipitaciones derivadas de efectos moduladores del clima, el incremento de la temperatura, la transformación del paisaje con la expansión de la frontera agrícola, la proximidad de áreas de cultivo con predios desatendidos (Tapiero 2013), el control químico inadecuado, y el desconocimiento de especies del patógeno, han venido afectando el cultivo provisto de una base genética reducida por la que han optado la mayoría de los agricultores de Caucho Natural a nivel nacional.

### 1.3.1 Agente Etiológico *Colletotrichum* spp.

Gran parte de los casos reportados de antracnosis en el pasado tienen como agente etiológico a *Colletotrichum* spp. anamorfo de *Glomerella* spp. Éste género fue seleccionado como el octavo grupo más importante de hongos patógenos de plantas en el mundo, basado en la percepción científica de su importancia económica (Dean et al., 2012). El número de especies patógenas reportadas de este organismo varía de 29 a cerca de 700, dependiendo de la interpretación taxonómica (Sutton, 1992; Dean et al., 2012). En la actualidad la diversidad de *Colletotrichum* se ha reorganizado por complejos de especies, a partir de información molecular de regiones altamente conservadas y comprende grupos con morfología y patogenicidad variable que cubren un amplio rango de hospederos. Se destacan los complejos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. boninense* (Damm et al., 2012; Damm et al., 2012; Weir et al., 2012), especialmente destructivos en frutales como la fresa (Garrido et al., 2009), los cítricos (Peres et al., 2008), los manzanos (Lee et al., 2007), el olivo (Talhinhas et al. 2011), los arándanos (Polashock et al. 2009), el pino (Dingley et al., 1972) y el Caucho Natural (Saha et al., 2002; Gasparoto et al. 2012; Sarmiento, 2013), entre otros. *Colletotrichum* spp. es reconocido por ser altamente destructivo y por poseer un gran potencial de infección cruzada consecuencia de la capacidad infectiva de varias de sus especies sobre un único hospedero, o por la facultad de una especie para infectar diversos hospederos (Afanador-Kafuri et al., 2003; Agrios, 2005; Talhinhas et al., 2005).

Varias especies de *Colletotrichum* spp. se han reportado como agentes causales de antracnosis afectando diferentes órganos del árbol de Caucho Natural entre las que se destacan, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc, *C. theobromicola*, *C. siamense* (Furtado et al., 2005; Sarmiento, 2013), *C. dematium*, *C. crassipes* (Wastie et al., 1970),

*C. acutatum*, *C. costarricense*, *C. limetticola*, *C. laticiphilum* (Brown et al., 1994; Sierra, 2010; Sarmiento, 2013), *C. boninense* y *C. karstii* (Sarmiento, 2013).

### **1.3.1.1 Estilos de vida de *Colletotrichum* spp**

En sentido amplio, los estilos de vida en las especies de *Colletotrichum* pueden clasificarse como necrótrofos, hemibiótrofos, latentes o quiescentes y endófitos; de los cuales el hemibiótrofo es el más común (De Silva et al., 2017). Las diferencias en el estilo de vida dependen de la especie *Colletotrichum*, la especie hospedero, la madurez fisiológica del hospedero y las condiciones ambientales. Por lo tanto, el género *Colletotrichum* ofrece una oportunidad única para analizar diferentes patrones de vida proporcionando información útil sobre las interacciones planta-patógeno.

### **1.3.1.2 Estilo de vida Necrotrófico**

Los patógenos necrótrofos son aquellos que infectan y colonizan activamente las células vegetales y conducen a la muerte celular (De Silva et al., 2017). Los necrótrofos suelen secretar enzimas líticas para degradar componentes vegetales o toxinas que matan los tejidos vegetales. Posteriormente, el patógeno sobrevive en el contenido de células muertas o moribundas para completar su ciclo de vida (Stone, 2001, Kleemann et al., 2012). Casi todas las especies de *Colletotrichum* desarrollan una etapa necrotrófica en algún momento de su ciclo de vida, excepto las pocas que existen enteramente como endofitas (Prusky et al., 2013).

### **1.3.1.3 Estilo de vida biotrófico y hemibiotrofo**

Un estilo de vida biotrófico en el sentido estricto es el lugar en el que el patógeno permanece dentro del tejido vegetal vivo y absorbe activamente los metabolitos de las plantas para su crecimiento sin matar las células de la planta (De Silva et al., 2017). Los hongos biótrofos producen estructuras especializadas, como haustorios, necesarios en el proceso de infección para las especies de *Colletotrichum*, generalmente no son biótrofos verdaderos. En la biotrofia obligada los hongos deben completar su ciclo de vida en el tejido vivo del hospedero. El grado de hemibiotrofia varía entre diferentes especies de *Colletotrichum* de acuerdo con su patrón de estilo de vida típico, ya que la transición de un estilo de vida biotrófico a necrótrofo depende de la etapa de desarrollo del hospedero y las condiciones ambientales (Arroyo et al., 2005; Peres et al., 2005; Ranathunge et al., 2012).

#### **1.3.1.4 Estilo de vida quiescente**

La quiescencia se define como un período prolongado de tiempo en el ciclo de vida del hongo en el que el patógeno existe en forma latente (Prusky et al., 2013). Durante la quiescencia, la actividad patogénica parece estar suspendida y casi no se produce crecimiento. En estos casos, los patógenos permanecen latentes dentro del tejido de la planta antes de que se desarrollen los síntomas de la enfermedad (Prusky, 1996, Gomes et al., 2013, Prusky et al., 2013, Shaw et al., 2016). Sin embargo, la etapa quiescente del estilo de vida es difícil de definir ya que cada especie fúngica puede mostrar diferentes transiciones de la quiescencia a la necrotrofia. Los cambios fisiológicos, bioquímicos y ambientales pueden activar diferentes vías de transducción de señales defensivas relacionadas con las respuestas tanto del hospedero como del patógeno, que son importantes para mantener o facilitar la transición del estilo de vida (Prusky et al., 2013).

#### **1.3.1.5 Estilo de vida endófito**

Los hongos endófitos viven dentro de las células vegetales del hospedero como simbiosis sin causar enfermedad aparente (Hardoim et al., 2015). Son taxonómicamente diversos en la naturaleza y comunes en casi todas las plantas vasculares (Lima et al., 2012). La mayoría de los hongos endófitos tienen una relación mutualista con su huésped en la que los hongos se benefician de tener un nicho, protección contra la desecación y acceso a nutrientes y productos fotosintéticos. A su vez, el hospedero puede beneficiarse debido a que los hongos endófitos pueden mejorar su crecimiento, la capacidad de tolerar estrés abiótico y aumentar la resistencia a patógenos (Busby et al., 2016).

### **1.3.2 Ciclo de la enfermedad**

#### **1.3.2.1 Pre infección y colonización**

El ciclo de la antracnosis es similar para las especies botánicas que infecta (Figura 1-1). En la mayoría de casos la infección causada por *Colletotrichum* spp. se inicia cuando el inóculo llega al hospedero por diferentes vías como el agua y el viento (Arias et al., 2007). En cuanto al proceso infectivo, se requieren de estructuras especializadas que involucran conidias, tubos germinativos, apresorios, hifas intracelulares e hifas secundarias necrotróficas. Una vez depositadas las conidias sobre la superficie del hospedero y en presencia de condiciones favorables se forma un tubo germinativo corto que inicia su diferenciación hacia apresorio en un periodo de entre 12 a 24 horas (Perfect et al., 1999; De Silva et al., 2017); esta etapa es desencadenada por la síntesis de proteínas específicas en el patógeno inducidas por moléculas de señalización de la planta hospedera. A continuación, con la maduración del apresorio por inclusión de capas de melanina y síntesis de componentes osmóticos activos (Agris, 2005; Munch et al., 2008) se forma un poro de penetración, del cual emerge un punto delgado de crecimiento o clavo (peg) que penetra la cutícula del hospedero (Wharton et al., 2004; De Silva et al., 2017).

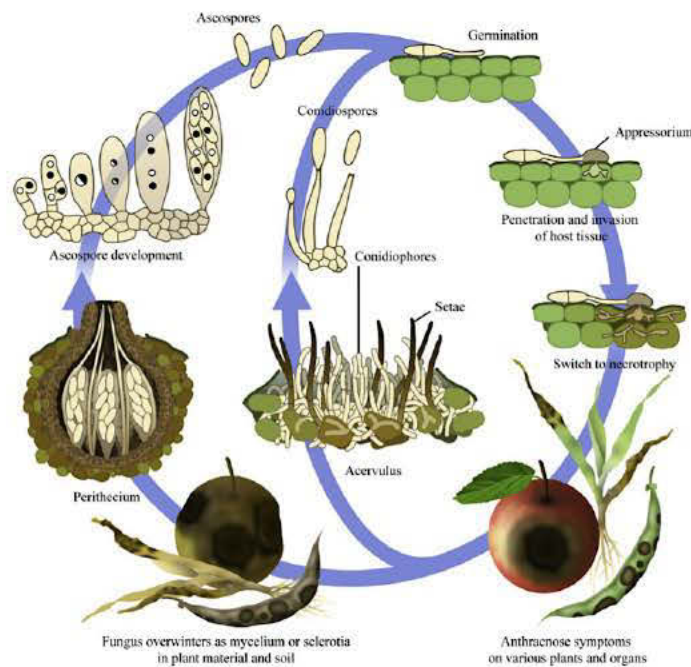
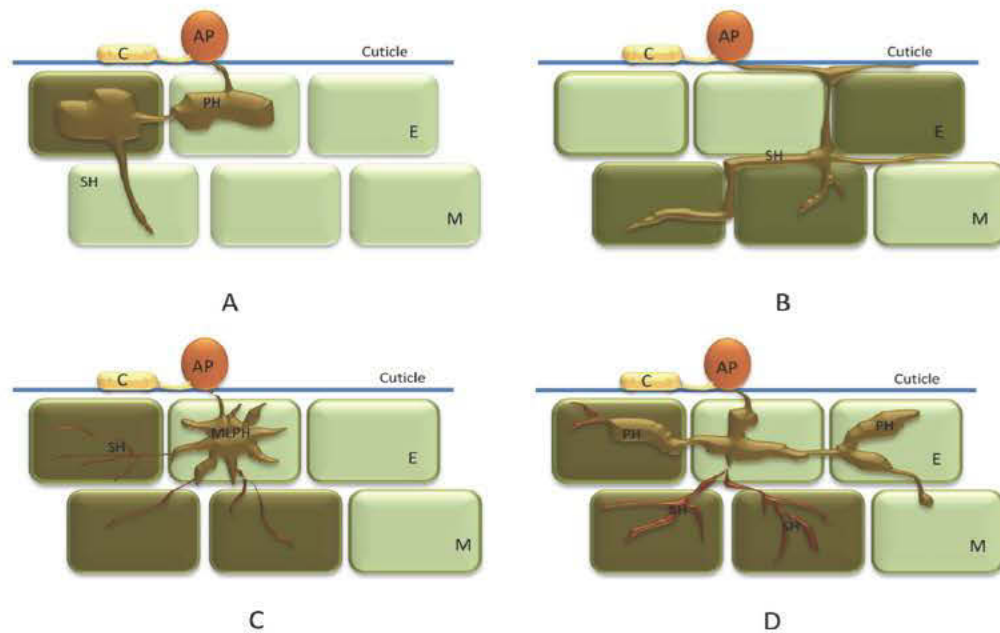


Figura 1-1. Ciclo de vida general para especies de *Colletotrichum* (De Silva et al., 2017).

### 1.3.2.2 Pos infección y colonización



Las estrategias de infección más adoptadas por muchas especies de *Colletotrichum* son hemibiotrofia intracelular (Figura 1-2A) o necrotrofia intramural subcutánea (Figura 1-2B) (O'Connell et al., 2012). En la hemibiotrofia intracelular, la fase temprana de la infección es la fase biotrófica asintomática en la que el clavo de penetración invade las células epidérmicas y forma las hifas primarias que producen vesículas de infección dentro de las células epidérmicas y mesofílicas. A esto le sigue la fase necrótica en la cual hifas secundarias delgadas crecen intracelularmente e intercelularmente mientras que secretan las enzimas que degradan la pared celular, matando las células huésped (O'Connell et al., 2012). En la infección necrotrofica intramural subcutánea, el hongo crece bajo la cutícula dentro de las paredes periclinales y anticlinales de las células epidérmicas sin penetrar en los protoplastos; se puede presentar una fase biotrófica corta antes de que las hifas intramurales inicien la destrucción de los tejidos colonizados



(Peres et al., 2005 ,Münch et al., 2008).

**Figura 1- 2. Estrategias de colonización adoptadas por especies de *Colletotrichum*.**  
**A.** Hemibiotrofia Intracelular. **B.** Necrotrofia subcuticular intramural. **C.** Infección hemibiotrófica localizada con hifa primaria multilobulada. **D.** Hemibiotrofia extendida. **C:**

Conidia, **AP**: Apresorio, **E**: Célula Epidérmica, **M**: Células Mesófilas, **PH**: Hifa primaria, **SE**: Hifa Secundaria, **MLPH**: Hifa primaria multilobulada (De Silva et al., 2017).

### 1.3.3 Síntomas en Caucho Natural

En el árbol de Caucho, la Antracnosis se caracteriza porque los síntomas iniciales de la enfermedad se manifiestan en las hojas jóvenes, yemas y frutos. Las lesiones en las hojas tienen de 1 a 3 mm de diámetro, generalmente son numerosas y dispersas en el limbo, presentan su porción central oscura, y un margen externo marrón con halo clorótico alrededor. Algunas de estas lesiones pueden presentar deterioro del tejido en su interior, síntoma comúnmente conocido como perdigoneo (Furtado et al., 1992). Cuando hay una afección intensa, las lesiones coalescen, ocasionando necrosis y deformación parcial o generalizada de folíolos e inflorescencias, que provocan su caída. Cuando los folíolos son infectados en estados próximos a la maduración, sus ápices se secan y arrugan. La enfermedad también afecta peciolo, formando lesiones necróticas alargadas hacia los extremos. En los frutos las lesiones ocasionan agrietamientos, pudrición de la corteza y momificación (Silveira et al., 1992). En las ramas verdes, las infecciones ocurren normalmente en las inserciones con el tallo. En panel de sangría se presentan lesiones necróticas profundas. En la mayoría de los casos, las lesiones presentan masas rosadas correspondientes a los cuerpos fructíferos asexuales (acérvulos) del hongo (Gasparotto et al., 1997). *Colletotrichum* spp. también puede ocasionar caída de las hojas (CLF) durante diferentes estados de desarrollo, promoviendo la generación de follaje nuevo, o durante la refoliación después del período anual de defoliación natural. En los clones susceptibles las consecuencias de la enfermedad son necrosis y deformación foliar e incluso caída de las hojas jóvenes afectadas en sus estados iniciales de desarrollo. Debido a que las hojas nuevas son sistemáticamente destruidas por la enfermedad durante toda la estación lluviosa, los árboles se debilitan, y la densidad foliar se disminuye sustancialmente con la muerte de ramas terminales (muerte descendente). Estos daños se reflejan en pérdidas de la producción de látex (Guyot et al., 2001).

### 1.3.4 Epidemiología

La colonización por *Colletotrichum* puede ocurrir en todos los órganos del árbol, pero la esporulación es mayor en lesiones jóvenes presentes en frutos maduros, donde los

acérvulos se forman en abundancia (Guyot et al., 2005). La dispersión del inoculo a largas distancias puede ser favorecida por la altura de los arboles y el patrón de infección depende fuertemente de la dirección e intensidad de los vientos. Las lluvias leves favorecen la dispersión desde los órganos afectados hacia abajo por escorrentía. La severidad de la enfermedad y la esporulación del patógeno aumentan con la concentración de conidias y el tiempo de mojamiento foliar (Guyot et al., 2005). La evidencia de síntomas se presenta 2 días después de la inoculación, pero frecuentemente, el periodo de incubación varía de 3 a 4 días, y la esporulación se presenta luego del quinto día (Furtado et al., 2005; Guyot et al., 2005). En condiciones de alta concentración de inoculo y largos periodos de humedad, las lesiones aparecen en todos los folíolos prácticamente al mismo tiempo (Guyot et al., 2005). En trabajos *in vitro* se ha encontrado que *C. acutatum* esporula en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) con temperaturas que varían entre los 10 y 40 ° C con un rango óptimo de 15 a 25 ° C, donde la germinación de conidias se presenta en condiciones de alta humedad relativa (95%) (Fernando, 2000).

### 1.3.5 Identificación

La plasticidad fenotípica, preferencia por el hospedero y estilo de vida clasificado en sentido amplio como necrótrofo, hemibiótrofo, quiescente y endófito (De Silva et al., 2017; Sreenivasaprasad et al., 2005), han sido criterios empleados para la identificación de especies de *Colletotrichum*, además de proporcionar información útil sobre las interacciones planta-patógeno (Freeman et al., 1997; Zabalgoeazcoa, 2008).

No obstante, las características morfológicas, como el tamaño y forma de las conidias, la conformación de células conidiógenas, tasa de crecimiento a temperaturas determinadas, el color de la colonia y el tipo de micelio (Mills, 1992; Jayasinghe, 1997; Menezes, 2002) dificultan la identificación y clasificación del patógeno, debido a su plasticidad fenotípica. Por lo cual, metodologías tradicionales, combinadas con herramientas bioquímicas y moleculares, deben considerarse complementarias en la obtención de diagnósticos más confiables.

Protocolos basados en características bioquímicas han sido efectivos en la diferenciación de especies del género *Colletotrichum* en Caucho; pruebas de tolerancia al benomil,

carbendazin y tiofanato de metilo, y prueba de la proteasa en medio de hidrolisis de caseína, permiten la diferenciación de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, siendo este último positivo para todos los casos (Jayasinghe, 1998; Sierra, 2010; Abang et al., 2003; Talhinhos et al., 2005).

La aplicación de marcadores moleculares para la detección de patógenos ha permitido la clasificación de especies y subespecies de diferentes géneros fúngicos. La unidad del ADN ribosomal (ADNr) es la más usada, y se encuentra compuesta por 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 et al., 1997; Lee et al., 2000; Shen et al., 2001; Álvarez et al., 2004, Sierra, 2010), propuestos como secuencias universales para la identificación fúngica (Schoch et al., 2011, 2012). No obstante, Cannon et al. (2012) menciona que la identificación de especies de *Colletotrichum* basada en la región ITS, ha demostrado ser insatisfactoria, ya que el fragmento del gen es conservado evolutivamente para distinguir entre taxones que pueden reconocerse empleando otros genes y combinaciones de genes. Por lo anterior, secuencias parciales informativas de genes como  $\beta$ -tubulina (*TUB2*), Factor de Elongación 1 alpha (*EF-1 $\alpha$* ), actina (*ACT*), calmodulina (*CAL*), quitina sintasa (*CHS-1*), gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (*GADPH*), DNA liasa (*APN2*), glutamina sintetasa (*GS*) y manganeso superóxido dismutasa (*SOD2*), están siendo empleadas para el diagnóstico y determinación de relaciones filogenéticas entre poblaciones (Cannon et al., 2012; Weir et al., 2012; Damm et al., 2012).

### 1.3.6 Control

El uso de materiales resistentes y el conocimiento del patógeno en cuanto a su estructura poblacional, estilo de vida, diversidad y patogenicidad, es necesario para el desarrollo de medidas eficientes, sostenibles y duraderas para el control de la antracnosis (Afanador-Kafuri et al., 2003).

El control químico se ha convertido en la alternativa de manejo convencional, no obstante, el impacto de la enfermedad ha conllevado al uso indiscriminado de fungicidas, incrementando los costos de manejo y la resistencia por parte del patógeno (Abang et

*al.*, 2003; Agrios, 2005). El control de la antracnosis en caucho puede realizarse en forma preventiva con fungicidas protectantes a base de clorotalonil y oxiclورو de cobre, en viveros, jardines clonales y en época de refoliación del cultivo; o mediante fungicidas sistémicos durante los estados de desarrollo maduro de las hojas. En el panel de sangría, el control puede ser efectuado pintando o pulverizando la superficie con fungicidas a base de clorotalonil, clorotalonil y tiofanato de metilo, propiconazol y tebuconazol (Furtado et al., 2005; Sierra, 2010).

Alternativas de manejo amigables con el medio ambiente como el control biológico requieren estudios que permitan el entendimiento de las interacciones en el patosistema, para garantizar una dinámica a favor del cultivo. Algunos autores reportan los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* y *Streptomyces* spp., con efecto positivo para el control de *C. gloeosporioides* en diferentes cultivos (Sharma et al., 2009; Vinchira et al., 2017).

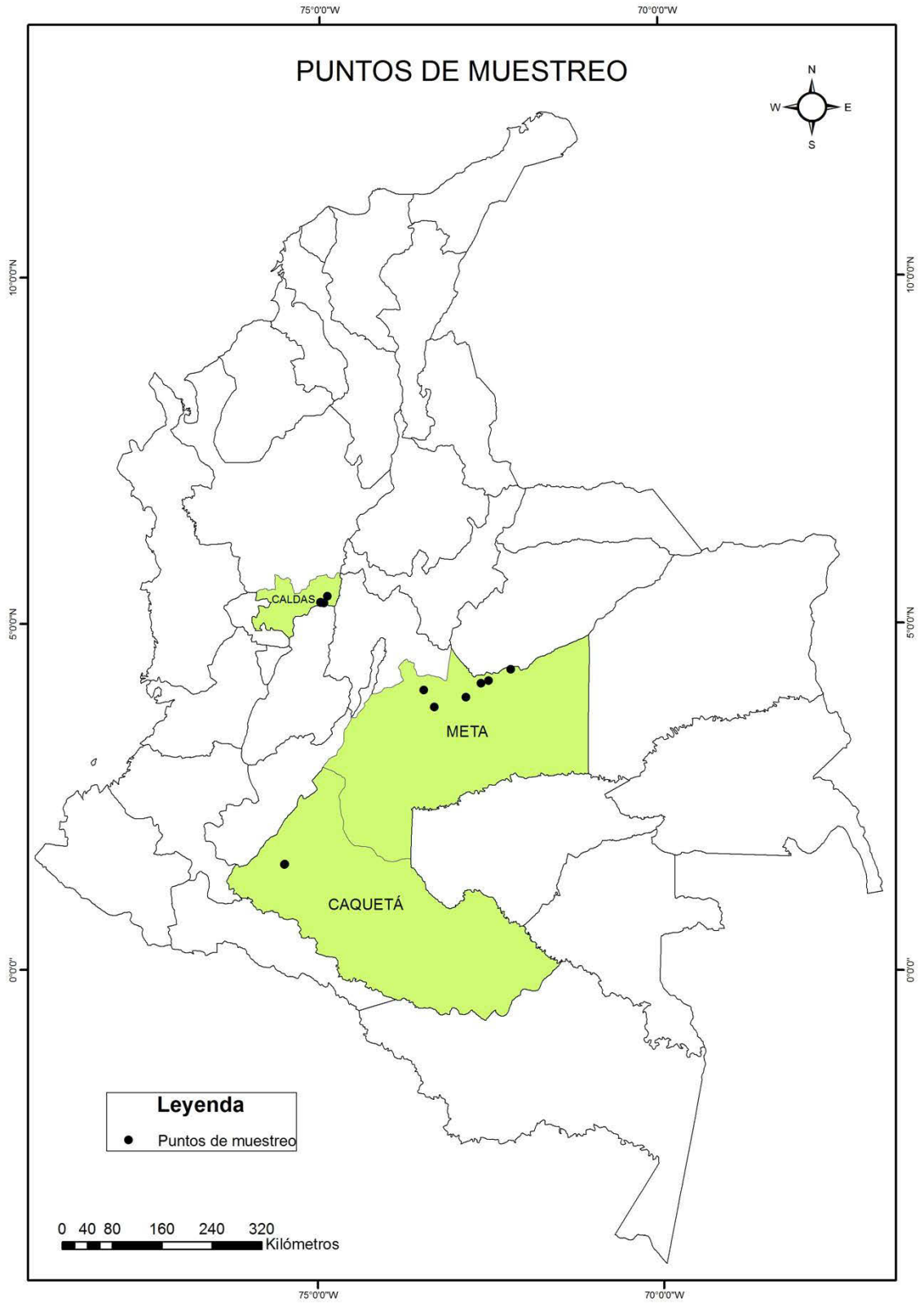
## 2. Metodología

### 2.1 Colecta de muestras

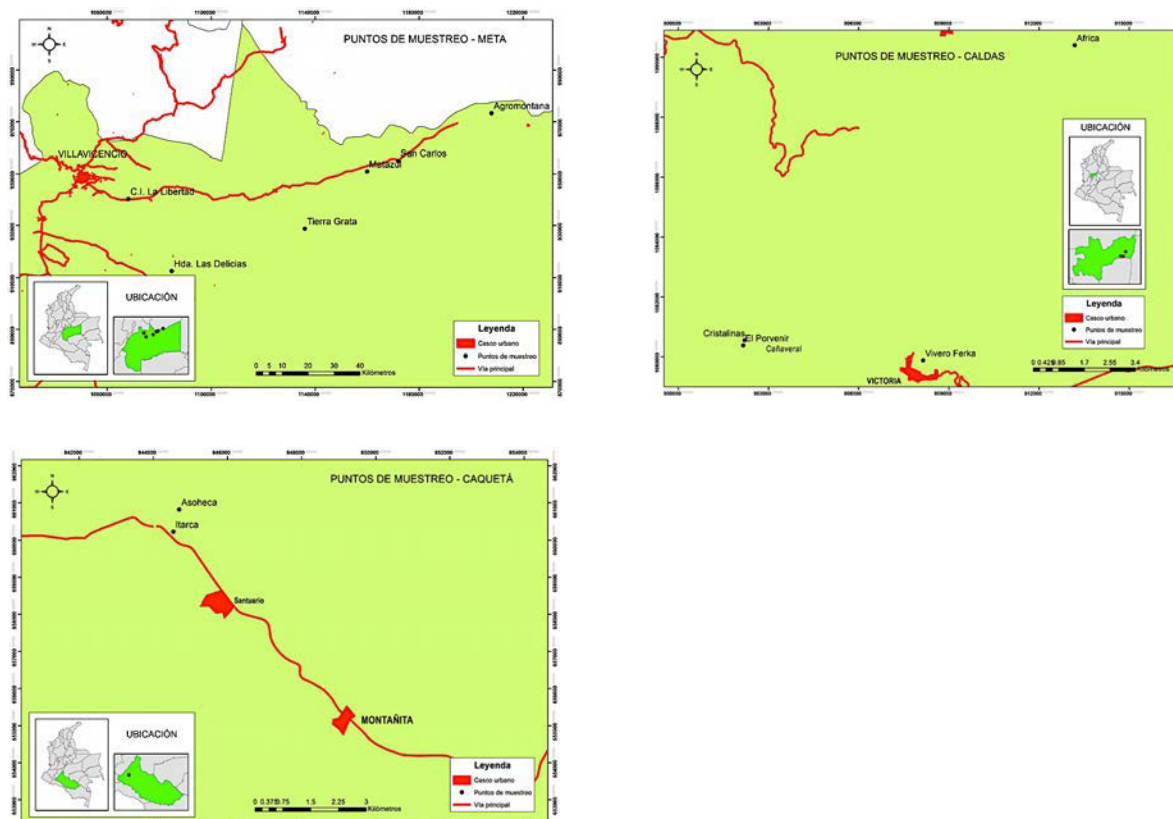
Se realizaron colectas de muestras de tejidos foliares lesionados en plantaciones de Caucho de 3 zonas productoras de Colombia, 1). Atillanura, Meta; 2). Piedemonte amazonico, Caqueta; y 3). Eje marginal cafetero, Caldas (Figura 2-1 y 2-2; Anexo A). Las muestras de tejido fueron tomadas de cultivos en fase de establecimiento con el clon más representativo del territorio nacional, RRIM 600. La selección se realizó según criterios de incidencia de la enfermedad, tipo de síntoma y diversidad de síntomas en órganos como hojas, foliolos y peciolo, en diferentes estados de desarrollo. Las muestras debidamente identificadas fueron depositadas en bolsas de papel y éstas en bolsas plásticas, y luego se almacenaron en una nevera de icopor portátil acondicionada con paquetes de hielo para conservar condiciones de baja temperatura.

### 2.2 Aislamiento y purificación de aislamientos del hongo

Los aislamientos se obtuvieron mediante el corte de secciones de tejido sano y enfermo de 0.5 cm; desinfección en etanol al 70% por 1 min y en hipoclorito de sodio al 1% por 2 min; enjuague de 1 min en agua destilada esterilizada; secado en papel toalla estéril; siembra de cinco porciones de tejido por caja petri con medio PDAC (papa 200 gr/l, dextrosa 20gr/l y agar 18 gr/l y ácido láctico 25%), e incubación a temperatura ambiente (+/-24°C) y luz continua. Los cultivos se evaluaron cada dos días hasta observar el desarrollo de las colonias. Estas últimas se identificaron de forma preliminar como pertenecientes al género *Colletotrichum* spp., mediante observación al microscopio de estructuras reproductivas tales como acérvulos, masas de esporas, presencia o ausencia del estado sexual y presencia o no de setas (aumento de 400X).



**Figura 2-1.** Puntos de muestreo foliar en plantaciones de Caucho Natural (*Hevea brasiliensis*).



**Figura 2-2.** Puntos de muestreo departamental en plantaciones comerciales de Caucho Natural (*Hevea brasiliensis*).

## 2.3 Cultivos monospóricos

Cultivos monoconidiales del hongo se obtuvieron mediante la siembra en agar agua (16 g/L de agar por 1 L de agua destilada) de una suspensión acuosa de esporas, ajustada a una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  esporas/ml. La suspensión acuosa se preparó a partir de masas de esporas desarrolladas en las colonias del hongo (a partir de tejido sembrado en PDAC). Dos a tres gotas de la suspensión de esporas fueron dispersadas sobre el medio con ayuda de un triángulo de vidrio, luego se incubaron durante la noche a temperatura ambiente ( $\pm 24^\circ\text{C}$ ) y bajo condiciones de oscuridad para facilitar su germinación. Las esporas germinadas se colectaron de forma individual utilizando para ello una aguja de disección en un estereomicroscopio con aumento de 400x. Cada espora germinada se depositó en una caja petri con medio PDAC y se incubaron a temperatura ambiente ( $\pm 24^\circ\text{C}$ ) y luz continua hasta obtener el desarrollo de colonias individuales.



## 2.4 Caracterización morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

La caracterización morfológica se realizó por medio de un análisis cualitativo de diferentes variables determinadas para estructuras reproductivas del hongo y características de crecimiento. La siembra en el medio seleccionado se realizó a partir de cultivos de 10 días de edad, crecidos en medio PDAC e incubados a 22°C. De cada aislamiento se extrajo un disco de 5 mm de diámetro con agar y micelio que se dispuso en el centro de una caja de Petri con medio PDAC y otra en medio de cultivo “Synthetic Nutrient Deficient Agar” SNA (glucosa 0,2 g/L, sucrosa 0,2 g/L, fosfato dihidrogenado de potasio 1 g/L, nitrato de potasio 1 g/L, sulfato anhidro de magnesio 0,25 g/L, cloruro de potasio 0,5 g/L, agar 14 g/L) (Nirenberg, 1976), con un periodo de incubación de 22+/-1°C bajo condiciones de 8 horas luz y 16 horas de oscuridad por 15 días. A cada aislamiento desarrollado en medio PDAC se le evaluaron variables de tipo morfológico, tales como el color de las colonias 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. Adicionalmente se determinó tasa de crecimiento de cada aislamiento (por triplicado) promediando la medición diaria de diámetro de la colonia (mm por día) cada 24 horas durante 10 días.

Para la caracterización de conidias se emplearon los aislamientos crecidos en medio SNA, realizando observaciones al microscopio (400X) para establecer su morfología y asignarlas a una de las tres categorías establecidas para este género: 1) Fusiformes, lados ahusados en ambos extremos, 2) cilíndricas con lados rectos y extremos redondos en ambos lados y 3) cilíndricas con lados rectos, un extremo puntudo y otro redondo (Smith *et al.*, 1990; Contreras, 2006). El tamaño de las conidias (largo y ancho) se determinó promediando el valor obtenido para 50 conidias seleccionadas al azar para cada aislamiento.

Para la producción de apresorios por aislamiento, se tomaron 20 uL de una suspensión conidial de concentración  $1 \times 10^6$  esporas/ml dispuesta sobre láminas portaobjeto. Los montajes fueron incubados bajo condiciones de cámara húmeda y temperatura de 22+/-1°C durante 24 horas. Pasado éste tiempo se seleccionaron 50 apresorios al azar para la determinación de su forma, y tamaño (largo y ancho) bajo el microscopio (400X).

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

## **2.5 Identificación molecular de aislamientos de *Colletotrichum* spp.**

### **2.5.1 Extracción de ADN**

De cada aislamiento de *Colletotrichum* spp. se tomó un disco de agar con micelio del hongo que fue sembrado en matraces con 100 ml de medio líquido papa dextrosa (papa 200 g/L, dextrosa 20 g/L, agua destilada 1L) más 60 µl de ampicilina (20mg/L) para su crecimiento. Cada aislamiento fue incubado a temperatura ambiente (+/-24 °C) y bajo condiciones de luz permanente por un periodo de 10 días. Pasado este tiempo, el micelio resultante se colectó por filtración al vacío, se secó por 24 horas a 37 °C y luego se maceró en un mortero mediante la adición de nitrógeno líquido.

La extracción y purificación del ADN se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Mahuku (2004) con modificaciones de Álvarez *et al.* (2004), consistió en la adición de 600 uL de buffer de extracción SDS (SDS 1%, NaCl 1.4M, EDTA 20mM y Tris-HCl pH 8.0 100 mM) al micelio macerado en un tubo eppendorf de 1.5 mil, incubación a 65°C por 30 minutos, adición de 200 uL de acetato de amonio 7.5M, incubación a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugación. El sobrenadante se trató con 500 µl de una mezcla (24:1) de cloroformo: alcohol isoamílico, seguido de una precipitación de ácidos nucleicos con 500 uL de alcohol isopropílico, y tratamiento con RNAsa (10mg/mil) por 30 minutos a 37°C. Recuperación de ácidos nucleicos por centrifugación. El ADN obtenido se disolvió en 50 uL de buffer Tris EDTA (Tris – HCL 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8.0). La calidad y concentración del ADN fue medida usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Posteriormente se realizó una dilución hasta

lograr una concentración final de ADN de 10 ng/uL para todas las muestras, para su uso como soluciones de trabajo en las pruebas de PCR.

### 2.5.2 Identificación a nivel de complejo de especies con cebadores específicos

La caracterización molecular de aislamientos de *Colletotrichum* spp. seleccionados de acuerdo a su diferencia en las características morfológicas y lugar de procedencia, se realizó partiendo de la identificación a nivel de complejos de especies mediante el uso de cebadores derivados de las regiones ITS del ADN ribosomal. La amplificación de regiones específicas a nivel de complejo de especies de *Colletotrichum*, se realizó utilizando una combinación del cebador universal ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') junto con el cebador específico para el complejo *C. acutatum* (*CaInt2*) (5' GGGGAGCCTCTCGCGG 3') (White et al., 1990; Sreenivasaprasad et al., 1996; Afanador-Kafuri et al., 2003), el complejo *C.gloeosporioides* (*CgInt*) (5' GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG 3') (White et al., 1990; Mills et al., 1992; Brown et al., 1996) y el complejo *C. boninense* (*Co1*) (5' GCCGTCCCCTGAAAAG 3') (Afanador – Kafuri et al., 2003; Pileggi et al., 2009). Como controles positivos se utilizó ADN de las cepas de *C. acutatum* s.lat.: GM77; de *C. gloeosporioides* s.lat.: GM29; de *C. boninense* s.lat.: GM01-L02, GM52-L01 y R033; y como control negativo se uso agua ultrapura grado HPLC en lugar de ADN.

Cada reacción (25 µl) estuvo conformada por 1X del buffer GoTaq PCR Green Master Mix (Promega), 0.5 µM de cada cebador, 20 ng de ADN y agua ultra pura grado HPLC para completar el volumen final. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador PTC\_100, MJ Research, Inc. (Watertown, MA) utilizando un perfil térmico con una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, una desnaturalización por ciclo a 95°C por 30 s, apareamiento por 30s a 61°C para *Co1*, 62°C para *CgInt*, 60°C para *CaInt2*, y una extensión a 72°C por 90 s, para un total de 40 ciclos de amplificación, seguido de una extensión final a 72°C por 4 min.

Los productos de PCR amplificados fueron analizados por electroforesis (6 µl/pozo) usando un gel de agarosa (1.2 %) teñido con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) para su visualización. En cada gel se adicionaran 2 µL de marcador de peso molecular 1

Kb (Gibco), con el fin de identificar el tamaño del fragmento amplificado para cada especie. Después de la electroforesis, las imágenes de los geles fueron capturadas usando un transiluminador de luz azul Safe Imager™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y una cámara digital Canon ELPH 500 HS (Canon USA Inc., Lake Success, NY).

### 2.5.3 Filogenia de especies de *Colletotrichum* spp.

Las secuencias de nucleótidos fueron determinadas para tres marcadores moleculares amplificados independientemente por PCR, incluyendo la región completa del espaciador interno transcrito (ITS) del ADNr y secuencias parciales de los genes *gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa* (*GADPH*) y *β-tubulina 2* (*TUB2*), usando los pares de cebadores ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (Cannon et al., 2012; Damm et al., 2012; Weir et al., 2012); GDF1 (5' GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA 3') y GDR1 (5'GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT3') (Guerber et al., 2003; Cannon et al., 2012; Damm et al., 2012) ; y Bt2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3') y Bt2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Cannon et al., 2012; Damm et al., 2012), respectivamente.

Cada reacción (50 µl) estuvo conformada por 1X del buffer GoTaq PCR Green Master Mix (Promega), 0.5 µM de cada cebador, 20 ng de ADN y agua ultra pura grado HPLC para completar el volumen final. Cada amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA) utilizando las siguientes condiciones: Un paso de desnaturalización a 95°C durante 3 min, seguido por 34 ciclos de desnaturalización (95°C por 1 min), hibridación (30 s a 52°C), elongación (72°C por 1 min), y un ciclo final de extensión (10 min a 72°C) para las región ITS y *TUB2*. Los parámetros de termociclaje para la amplificación del gen *GADPH*, consistieron de un paso de desnaturalización (94°C por 4 min), seguido por 34 ciclos de desnaturalización (94°C por 45 s), hibridación (45 s a 60°C), elongación (72°C por 1 min), y una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR amplificados seran analizados por electroforesis y visualizados, tal como se describió anteriormente.

Los productos de amplificación fueron limpiados antes de ser enviados a secuenciar. A un volumen de 22 µl de producto amplificado se le adicionó igual volumen de una solución de PEG al 20% (20 g de Polyetilene glicol y 2.5M de NaCl en 100 mil de agua

ultrapura), homogenización e incubación a temperatura ambiente ( $\pm 24^{\circ}\text{C}$ ) por 15 min., centrifugación, lavado con 100  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, centrifugación, secado del precipitado y resuspensión de éste con 15  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura. La calidad del ADN después del tratamiento se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa del 0.8%.

Los electroferogramas obtenidos fueron editados, ensamblados y analizados empleando el software Genious v 8.1.9. La concatenación de secuencias por aislamiento, se realizó siguiendo el orden, *GADPH*, ITS y *TUB2*. El alineamiento multilocus por Complejo de especies de *Colletotrichum* se realizó con Clustal W, y con el software MEGA v5.05, se seleccionó el modelo estadístico de sustitución de nucleótidos de mejor ajuste, usando el Criterio de Información Akaike corregido (AICc).

Para la comparación de especies, se usaron los datos moleculares de los genes estudiados, que han sido depositados en el Genbank, y que corresponden a especies tipo y aislamientos auténticos (Tabla 2-1). La filogenia fue estimada mediante Inferencia Bayesiana en el programa Genious v 8.1.9. Bajo esta metodología se eligió la filogenia con mejor probabilidad posterior muestreando los árboles de toda la distribución de probabilidades posteriores usando Metropolis Markov Chain Monte Carlo (MCMC). El análisis se realizó dos veces, cada uno empezando en un árbol diferente seleccionado al azar; se corrieron dos cadenas simultaneas por 10.000.000 generaciones, con muestreo de árboles cada 1000 generaciones (resultando en un total de 10.000 árboles). Finalmente, el árbol filogenético consenso resultante fue ajustado a un límite de probabilidad posterior de  $\geq 0,5$ , para determinar la divergencia y delimitar taxonómicamente las especies.

## 2.6 Pruebas de Patogenicidad

Se emplearon hojas desprendidas en estado fenológico C (receptivas a la enfermedad) del clon RRIM600 (susceptible). La superficie de cada una de ellas se desinfecto de acuerdo a Bernstein *et al.*, (1995) y los sitios a inocular fueron marcados con lápiz de cera. La suspensión de conidias de *Colletotrichum* spp. se ajustó a una concentración inicial de  $10^6$  conidias/ml en cámara de Neubauer. La inoculación de cada aislamiento se realizó en cuatro puntos de una misma hoja, por triplicado. Los controles negativos correspondieron a hojas sobre los cuales se inoculó agua destilada estéril, y el control positivo correspondió a un aislamiento patogénico corroborado previamente. Todos los

montajes fueron dispuestos en cámaras húmedas (90-100%), empleando benzimidazol (50 ppm) como solución humectante. Se realizaron observaciones diarias de desarrollo de la enfermedad, registrando el periodo de incubación, la presencia o ausencia de síntomas y signos del patógeno, y el tamaño de la lesión. Las cámaras fueron incubadas a temperatura de +/-24 °C, por un período de 10 días.

Los datos fueron recopilados en una matriz construida con las medias o medianas de las réplicas realizadas para cada aislado y cada una de las variables evaluadas. El análisis de los datos se realizó convirtiendo la matriz de variables de patogenicidad 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.

**Tabla 2-1.** Descripción de unidades taxonómicas operacionales de *Colletotrichum* spp. empleadas para los análisis filogenéticos.

Complejo	Especies	Cepas Tipo	Hospedero	Procedencia	GenBank Nº Accesoión		
					ITS	GADPH	TUB2
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. aenigma</i>	ICMP18608	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244	JX010044	JX010389
		ICMP18686	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japón	JX010243	JX009913	JX010390
	<i>C. aeshynomenes</i>	ICMP17673	<i>Aeshynomene virginica</i>	USA	JX010176	JX009930	JX010392
	<i>C. alatae</i>	ICMP 17919	<i>Dioscorea alata</i>	India	JX010190	JX009990	JX010383
		ICMP18122	<i>Dioscorea alata</i>	Nigeria	JX010191	JX010011	JX010449
	<i>C. alienum</i>	IMI313842	<i>Persea americana</i>	Australia	JX010217	JX010018	JX010385
		ICMP18621	<i>Persea americana</i>	Nueva Zelanda	JX010246	JX009959	JX010386
	<i>C. aotearoa</i>	ICMP18537	<i>Coprosma</i> sp.	Nueva Zelanda	JX010205	JX010005	JX010420
		ICMP18533	<i>Prumnopitys ferruginea</i>	Nueva Zelanda	JX010197	JX010026	JX010416
	<i>C. asianum</i>	ICMP18696	<i>Mangifera indica</i>	Australia	JX010192	JX009915	JX010384
		ICMP18580	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	FJ972612	JX010053	JX010406
	<i>C. clidemiae</i>	ICMP18658	<i>Clidemia hirta</i>	USA Hawaii	JX010265	JX009989	JX010438
	<i>C. cordylinicola</i>	ICMP18579	<i>Cordyline fruticosa</i>	Tailandia	JX010226	JX009975	JX010440
	<i>C. fructicola</i>	ICMP18613	<i>Limonium sinuatum</i>	Israel	JX010167	JX009998	JX010388
		ICMP18646	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panamá	JX010173	JX010032	JX010409
	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP17821	<i>Citrus sinensis</i>	Italia	JX010152	JX010056	JX010445
	<i>C. horii</i>	ICMP12942	<i>Diospyros kaki</i>	Nueva Zelanda	GQ329687	GQ329685	JX010375
		ICMP10492	<i>Diospyros kaki</i>	Japón	GQ329690	GQ329681	JX010450
	<i>C. musae</i>	ICMP17817	<i>Musa sapientum</i>	Kenia	JX010142	JX010015	JX010395
		ICMP19119	<i>Musa</i> sp.	USA	JX010146	JX010050	HQ596280
<i>C. nupharicola</i>	ICMP17938	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX010189	JX009936	JX010397	
	ICMP18187	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX010187	JX009972	JX010398	

	<i>C. psidii</i>	ICMP19120	<i>Psidium</i> sp.	Italia	JX010219	JX009967	JX010443
	<i>C. queenslandicum</i>	ICMP1778	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX010276	JX009934	JX010414
		ICMP18705	<i>Coffea</i> sp.	Fiji	JX010185	JX010036	JX010412
	<i>C. salsolae</i>	ICMP19051	<i>Salsola tragus</i>	Hungría	JX010242	JX009916	JX010403
	<i>C. siamense</i>	ICMP12567	<i>Persea americana</i>	Australia	JX010250	JX009940	JX010387
		CBS 125378	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	JX010171	JX009924	JX010404
	<i>C. theobromicola</i>	ICMP17958	<i>Stylosanthes guianensis</i>	Australia	JX010291	JX009948	JX010381
		ICMP18566	<i>Olea europaea</i>	Australia	JX010282	JX009953	JX010376
	<i>C. ti</i>	ICMP5285	<i>Cordyline australis</i>	Nueva Zelanda	JX010267	JX009910	JX010441
	<i>C. tropicale</i>	ICMP18653	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010264	JX010007	JX010407
		ICMP 18672	<i>Litchi chinensis</i>	Japón	JX010275	JX010020	JX010396
	<i>C. xanthorrhoeae</i>	ICMP17903	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Australia	JX010261	JX009927	JX010448
<b>C. acutatum</b>	<i>C. acerbum</i>	CBS 128530	<i>Malus domestica</i> , bitter rot of fruit	Nueva Zelanda	JQ948459	JQ948790	JQ950110
	<i>C. acutatum</i>	CBS 112996	<i>Carica papaya</i>	Australia	JQ005776	JQ948677	JQ005860
	<i>C. brisbanense</i>	CBS 292.67	<i>Capsicum annuum</i>	Australia	JQ948291	JQ948621	JQ949942
	<i>C. australe</i>	CBS 116478	<i>Trachycarpus fortunei</i>	Sudáfrica	JQ948455	JQ948786	JQ950106
	<i>C. chrysanthemi</i>	IMI 364540	<i>Chrysanthemum coronarium</i> , leaf spot	China	JQ948273	JQ948603	JQ949924
	<i>C. cosmi</i>	CBS 853.73	<i>Cosmos</i> sp.	Holanda	JQ948274	JQ948604	JQ949925
	<i>C. costaricense</i>	CBS 330.75	<i>Coffea arabica</i>	Costa Rica	JQ948180	JQ948510	JQ949831
	<i>C. cuscutae</i>	IMI 304802	<i>Cuscuta</i> sp.	Dominica	JQ948195	JQ948525	JQ949846
	<i>C. fioriniae</i>	CBS 128517	<i>Fiorinia externa</i> (elongate hemlock scale, insect)	USA	JQ948292	JQ948622	JQ949943
	<i>C. godetiae</i>	CBS129816	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> , fruit rot	Holanda	JQ948418	JQ948749	JQ950069
		IMI381927	<i>Prunus avium</i>	UK	JQ948408	JQ948739	JQ950059
	<i>C. guajavae</i>	IMI 350839	<i>Psidium guajava</i> , fruit	India	JQ948270	JQ948600	JQ949921
	<i>C. indonesiense</i>	CBS 127551	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonesia	JQ948288	JQ948618	JQ949939
	<i>C. johnstonii</i>	CBS 128532	<i>Solanum lycopersicum</i> , fruit rot	Nueva Zelanda	JQ948444	JQ948775	JQ950095
	<i>C. kinghornii</i>	CBS 198.35	<i>Phormium</i> sp.	Reino Unido	JQ948454	JQ948785	JQ950105
	<i>C. laticiphilum</i>	CBS 112989	<i>Hevea brasiliensis</i>	India	JQ948289	JQ948619	JQ949940
	<i>C. limeticola</i>	CBS 114.14	<i>Citrus aurantifolia</i>	USA Florida	JQ948193	JQ948523	JQ949844
	<i>C. lupini</i>	CBS 109225	<i>Lupinus albus</i>	Ucrania	JQ948155	JQ948485	JQ949806
	<i>C. melonis</i>	CBS 159.84	Cucumis melo	Brasil	JQ948194	JQ948524	JQ949845
	<i>C. nymphaeae</i>	CBS 515.78	<i>Nymphaea alba</i> , leaf spot	Holanda	JQ948197	JQ948527	JQ949848
	<i>C. orchidophilum</i>	CBS 632.80	<i>Dendrobium</i> sp.	USA	JQ948151	JQ948481	JQ949802
	<i>C. paxtonii</i>	IMI 165753	<i>Musa</i> sp.	Santa Lucia	JQ948285	JQ948615	JQ949936
	<i>C. phormii</i>	CBS 118194	<i>Phormium</i> sp.	Alemania	JQ948446	JQ948777	JQ950097
	<i>C. pyricola</i>	CBS 128531	<i>Pyrus communis</i> , fruit rot	Nueva Zelanda	JQ948445	JQ948776	JQ950096
	<i>C. rhombiforme</i>	CBS 129953	<i>Olea europaea</i>	Portugal	JQ948457	JQ948788	JQ950108
	<i>C. salicis</i>	CBS 607.94	<i>Salix</i> sp.	Holanda	JQ948460	JQ948791	JQ950111
	<i>C. scovillei</i>	CBS 126529	<i>Capsicum</i> sp.	Indonesia	JQ948267	JQ948597	JQ949918
	<i>C. simmondsii</i>	CBS 122122	<i>Carica papaya</i> , fruit	Australia	JQ948276	JQ948606	JQ949927
	<i>C. sloanei</i>	IMI 364297	<i>Theobroma cacao</i> , leaf	Malasia	JQ948287	JQ948617	JQ949938
	<i>C. tamarilloi</i>	CBS 129814	<i>Solanum betaceum</i> , fruit, anthracnose	Colombia	JQ948184	JQ948514	JQ949835

	<i>C. walleri</i>	CBS 125472	<i>Coffea</i> sp., leaf tissue	Vietnam	JQ948275	JQ948605	JQ949926
<b><i>C. boninense</i></b>	<i>C. annellatum</i>	CBS129826	<i>Hevea brasiliensis</i> , leaf	Colombia	JQ005222	JQ005309	JQ005656
	<i>C. boninense</i>	CBS128506	<i>Solanum lycopersicum</i> , fruit rot	Nueva Zelanda	JQ005157	JQ005244	JQ005591
	<i>C. brasiliense</i>	CBS128528	<i>Passiflora edulis</i> , fruit	Brasil	JQ005234	JQ005321	JQ005668
	<i>C. brassicicola</i>	CBS101059	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> , leaf spot	Nueva Zelanda	JQ005172	JQ005259	JQ005606
	<i>C. colombiense</i>	CBS129817	<i>Passiflora edulis</i> , leaf	Colombia	JQ005173	JQ005260	JQ005607
	<i>C. cymbidicola</i>	CBS123757	<i>Cymbidium</i> sp.	Japón	JQ005168	JQ005255	JQ005602
	<i>C. hippeastrii</i>	CBS 241.78	<i>Hippeastrum</i> sp.	Holanda	JQ005232	JQ005319	JQ005666
	<i>C. karstii</i>	CBS128545	<i>Capsicum annuum</i>	Nueva Zelanda	JQ005207	JQ005294	JQ005641
		CBS106.91	<i>Carica papaya</i> , fruit spots	Brasil	JQ005220	JQ005307	JQ005654
	<i>C. novae-zelandiae</i>	CBS130240	<i>Citrus</i> sp. (grapefruit)	Nueva Zelanda	JQ005229	JQ005316	JQ005663
	<i>C. oncidii</i>	CBS130242	<i>Oncidium</i> sp., leaf	Alemania	JQ005170	JQ005257	JQ005604
	<i>C. parsonsiae</i>	CBS128525	<i>Parsonsia capsularis</i> , leaf endophyte	Nueva Zelanda	JQ005233	JQ005320	JQ005667
	<i>C. petchii</i>	CBS125957	<i>Dracaena</i> , leaf spots	Holanda	JQ005226	JQ005313	JQ005660
	<i>C. phyllanthi</i>	CBS175.67	<i>Phyllanthus acidus</i> , anthracnose	India	JQ005221	JQ005308	JQ005655
	<i>C. toluosum</i>	CBS102667	<i>Passiflora edulis</i> , leaf blotch	Nueva Zelanda	JQ005165	JQ005252	JQ005599

\*CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures (Netherlands), ICMP = International Collection of Microorganisms from Plants, IMI = CABI Genetic Resource Collection (UK)



## 3. Resultados y discusión

### 3.1 Obtención de Aislamientos

Los aislamientos obtenidos a partir de hojas del árbol de Caucho Natural con síntomas de antracnosis, resultaron en la identificación por reconocimiento de rasgos macro y microscópicos, asociados al género *Colletotrichum*. Se obtuvo un total de 40 aislamientos monospóricos para los núcleos productivos seleccionados, 23 para el departamento del Meta, 9 para Caldas y 8 para el Caquetá (Anexo B).

### 3.2 Caracterización morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

A partir del total de datos morfológicos que comprendieron color de la colonia en medio de cultivo; tamaño y forma de conidios y apresorios; y tasa de crecimiento de cada aislamiento, se construyó una matriz mixta conformada por tres tipos de variables (Anexo C): 1. Variables continuas: tasa de crecimiento micelial, largo y ancho de conidios y apresorios; 2. Variables categóricas: color de la colonia, forma de conidios y apresorios; y 3. Variables binarias: presencia o ausencia de acérvulos. Morfológicamente la colección fue heterogénea, incluso en un mismo aislamiento se observaron diferentes variantes para una misma característica (Tabla 3-1; Anexo D), que requirieron conforme a las observaciones, la asignación de categorías con más de un rasgo.

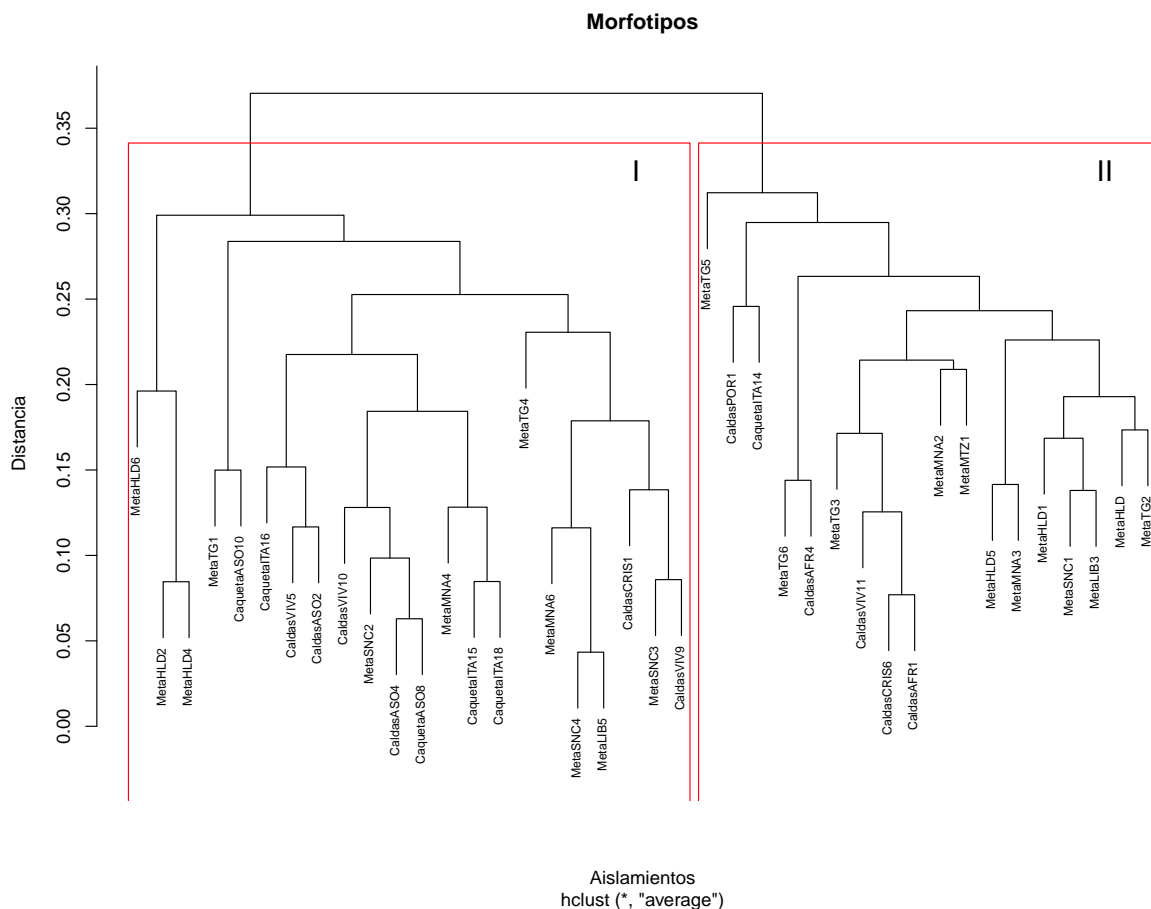
El tratamiento de los datos con el coeficiente de similaridad y distancias de Gower, y la respectiva representación de agrupamientos por el método UPGMA, permitió un análisis apropiado de la matriz generada con variables de diferente naturaleza (Anexo C), y generó la discriminación de dos morfotipos diferentes para los aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos (Figura 3-1).

**Tabla 3-1.** Descripción de las categorías morfológicas empleadas en la caracterización de aislamientos de *Colletotrichum* spp. en Caucho.

Categoría	Color de la colonia	Forma de los conidios	Forma de los apresorios
1	Blanca, anillos gris oliva, masas conidiales naranja.	Fusiformes, lados ahusados en ambos extremos.	Simples en su contorno, sin lobulaciones.
2	Blanca, anillos concéntricos blancos.	Cilíndricas con lados rectos y extremos redondos en ambos lados	Poco lobulados en su contorno.
3	Salmón, masas conidiales en anillos concéntricos, bordes blancos.	Cilíndricos, lados rectos, un extremo redondo y otro fusiforme	Complejos, altamente lobulados en su contorno.
4	Gris claro, anillos concéntricos gris oscuro, masas conidiales naranja	Categoría 2 y 3	Categoría 1 y 2
5	Gris oliva oscuro, anillos concéntricos negro oliva, masas conidiales naranja.	Categoría 1 y 2	Categoría 2 y 3

Las descripciones particulares para los dos morfotipos identificados dentro de la colección de *Colletotrichum* spp. aislada de Caucho Natural se muestran en la Tabla 3-2. El Morfotipo 1, presentó variabilidad morfológica con respecto al color de la colonia, sin embargo predominaron las colonias blancas con anillos concéntricos al igual que el morfotipo 2; la tasa de crecimiento media fue levemente mayor que la observada para el morfotipo 2; fueron predominantes los conidios cilíndricos con lados rectos, ambos extremos redondos ó uno fusiforme; presentó apresorios poco lobulados, y complejos altamente lobulados en su contorno; todos los aislados presentaron acérvulos.

El Morfotipo 2, presentó alta variabilidad morfológica en cuanto al color de la colonia, predominando las blancas al igual que el morfotipo 1; prevalecieron los conidios cilíndricos de lados rectos, un extremo redondo y otro fusiforme; los apresorios fueron simples en su contorno, sin lobulaciones, ó poco lobulados; ninguno de los aislamientos desarrollo acérvulos en medio de cultivo.



**Figura 3-1.** Dendrograma construido por el método UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Gower de las variables morfológicas evaluadas en la colección de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de Caucho natural.

El color de la colonia no presentó diferencias entre morfotipos al compartir varias categorías y predominar las colonias blancas (Tabla 3-2). Las variables continuas de tamaño de conidios y apresorios resultaron ser las más ambiguas, su marcada variación no permitió por sí sola una clara diferenciación entre aislados (Cannon et al., 2012). Según Weir et al., (2012); el tamaño de los conidios para todas las especies identificadas como pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides* es razonablemente uniforme, e incluso su diferenciación con los complejos *C. acutatum* y *C. boninense* es difícil, debido a que discrepan ligeramente en la relación largo / ancho (Moriwaki et al., 2003; Damm et al., 2012a; Damm et al., 2012b), con rangos de tamaño que a menudo se superponen

(Cannon et al., Weir et al., 2012). Situación similar se presentó con el tamaño de apresorios, debido a que ambos morfotipos fueron comparables con el rango medio para los complejos, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*, con medidas de 7–17 × 4–9.5 µm (Cannon et al., 2012); 11.3 ± 2.4 × 6.2 ± 1.2 µm (Damm et al., 2012a); y 10.1 ± 2.5 × 7.1 ± 1.4 µm (Damm et al., 2012b); respectivamente.

**Tabla 3-2.** Características de los morfotipos discriminados mediante coeficiente de similitud de Gower.

Variable	Mínimo/Máximo	Morfotipo 1	Morfotipo 2
Tasa de crecimiento (mm/día)	Mínimo/Máximo	2,22 - 8,74	2,59 - 8,70
	Media	7,35	6,70
Diámetro final colonia (mm/10 días)	Media	73,5	67
Color colonia	Categorías	1, 2, 3, 4 y 5	1, 2, 3, 4 y 5
	Mediana	2	2
Acérvulos	Presencia/ausencia	0 y 1	0 y 1
	Mediana	1	0
Forma de conidios	Categorías	1, 2, 3, 4 y 5	1, 2, 3, 4 y 5
	Mediana	4	3
Largo de conidios (µm)	Mínimo/Máximo	8,99 - 16,27	8,58 - 15,08
	Media	10,91	10,82
Ancho de conidios (µm)	Mínimo/Máximo	2,60 - 4,00	2,6 - 3,74
	Media	3,22	3,25
Forma de apresorios	Categorías	2, 3 y 5	1, 2, y 4
	Mediana	5	4
Largo de apresorios (µm)	Mínimo/Máximo	9,82 - 12,68	7,02 - 15,44
	Media	11,30	11,42
Ancho de apresorios (µm)	Mínimo/Máximo	4,78 - 7,02	4,10 - 6,91
	Media	5,67	5,64

Variabes como tasa de crecimiento diario, forma de conidios y apresorios, y presencia o ausencia de acérvulos en medio de cultivo, permitieron la determinación de morfotipos (Tabla 3-2). La tasa de crecimiento diario puede llegar a ser útil en el establecimiento de diferencias entre especies; sin embargo, los valores estimados dependen de las características del medio de cultivo y las condiciones de incubación (Weir et al., 2012). Luego de 10 días a 22° C, el morfotipo 1 desarrolló un diámetro medio de la colonia 73,5

mm; a diferencia del morfotipo 2 que presento una tasa de crecimiento menor y un diámetro medio de la colonia de 67 mm (Tabla 3-2). El tamaño medio de la colonia en medio de cultivo para especies del complejo *C. gloeosporioides* fue 61,56 mm durante un periodo de 10 días a 18° C (Weir et al., 2012); para el complejo *C. acutatum* de 35 mm a 20° C (Damm et al., 2012a); y para el complejo *C. boninense* de 40 mm a 20° C (Damm et al., 2012b). Adicionalmente, se pueden presentar cultivos de crecimiento rápido que alcanzan el diámetro de la placa de agar de 85 mm en menor tiempo (Weir et al., 2012).

La forma de conidios y apresorios aunque diferenciales, fueron ambiguas para los morfotipos obtenidos con la repetición de observaciones para una misma categoría. La característica morfológica más conocida de *C. acutatum* es la forma de sus conidios con extremos agudos (Simmonds, 1965). Sin embargo, otras formas conidiales, especialmente las cilíndricas con un solo extremo agudo, se encuentran frecuentemente en cepas que han sido repetidamente subcultivadas, y en especies de otros complejos de *Colletotrichum* spp. Incluso la diferenciación entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* es difícil, porque existen muchas cepas intermedias con un número restringido de conidios fusiformes típicos y muchos cilíndricos (Damm et al., 2012). De igual manera, los conidios de *C. boninense* son similares a las de *C. gloeosporioides* y pueden diferir ligeramente en la presencia de una cicatriz prominente en la base del conidio (Moriwaki et al., 2003), que no fue apreciable para los aislamientos analizados provenientes de Caucho Natural. La forma conidial es, por lo tanto, un carácter poco fiable para el reconocimiento de especies y parece depender del hospedero/origen del aislado, o del medio de crecimiento (Damm et al., 2012).

La forma del apresorio puede llegar a ser semejante al interior de una misma especie del genero *Colletotrichum* spp. (Cannon et al., 2012); sin embargo, también se presentó la reiteración de una o más características para la misma categoría. Lo anterior, concuerda con lo reportado por diferentes autores, ya que en cuanto a aspectos morfológicos para el complejo *C. gloeosporioides*, p.ej., se describen apresorios globosos, cortos y cilíndricos, simples o lobulados, elípticos a fusiformes, solitarios o agrupados, (Weir et al., 2012). Los apresorios en el complejo *C. acutatum* se caracterizan por ser pigmentados, simples en grupo o solitarios, a veces ondulados (Simmonds 1965, Damm et al., 2012a). Y para el complejo *C. boninense* se reportan en cadenas cortas o solitarios, pigmentados

de paredes gruesas, borde entero o crenado, raramente lobulados, de paredes lisas y forma irregular, pero a menudo con forma de bala o navicular con una punta aguda (Damm et al., 2012b).

La presencia o ausencia de acérvulos presentó diferencias en los morfotipos obtenidos, por lo que esta variable podría definir especies debido a que no todas los desarrollan (Weir et al., 2012; Damm et al., 2012a; Damm et al., 2012b). Adicionalmente, es importante mencionar que la presencia/ausencia puede depender del historial y el método de almacenamiento de los aislamientos, impactando directamente sobre las características de *Colletotrichum* spp. en medio de cultivo. Las cepas pueden volverse "obsoletas", eludiendo la producción de pigmentos; el micelio aéreo a menudo se vuelve muy denso, y además puede perderse la capacidad de formar acérvulos y otras estructuras como conidios o peritecios bien diferenciados (Weir et al., 2012).

Diferentes autores sugieren que los caracteres morfológicos del hongo no son suficientes para la clasificación y definición de taxas (Cay et al., 2009 y Hyde et al., 2009). Los resultados obtenidos son consistentes con lo propuesto por autores como Bernstein et al., (1995); Freeman et al., (1998); Peres et al., (2005); Garrido et al., (2009); Hyde et al., (2009); y Weir et al., (2012), quienes afirman que las características morfológicas de *Colletotrichum* spp. pueden variar bajo diferentes condiciones de crecimiento (medio de cultivo, temperatura, régimen de luz..), ó pueden perderse con repiques sucesivos de un mismo aislamiento. Para Sutton (1992), "Ningún progreso en la sistemática e identificación de aislamientos pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides* es probable si depende sólo de las características morfológicas". Lo anterior ratifica que la diversidad morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp., requiere del uso de técnicas moleculares complementarias que permitan la diferenciación de especies (Freeman et al., 1998; Abang et al., 2003; Cay et al., 2009 y Hyde et al., 2009).

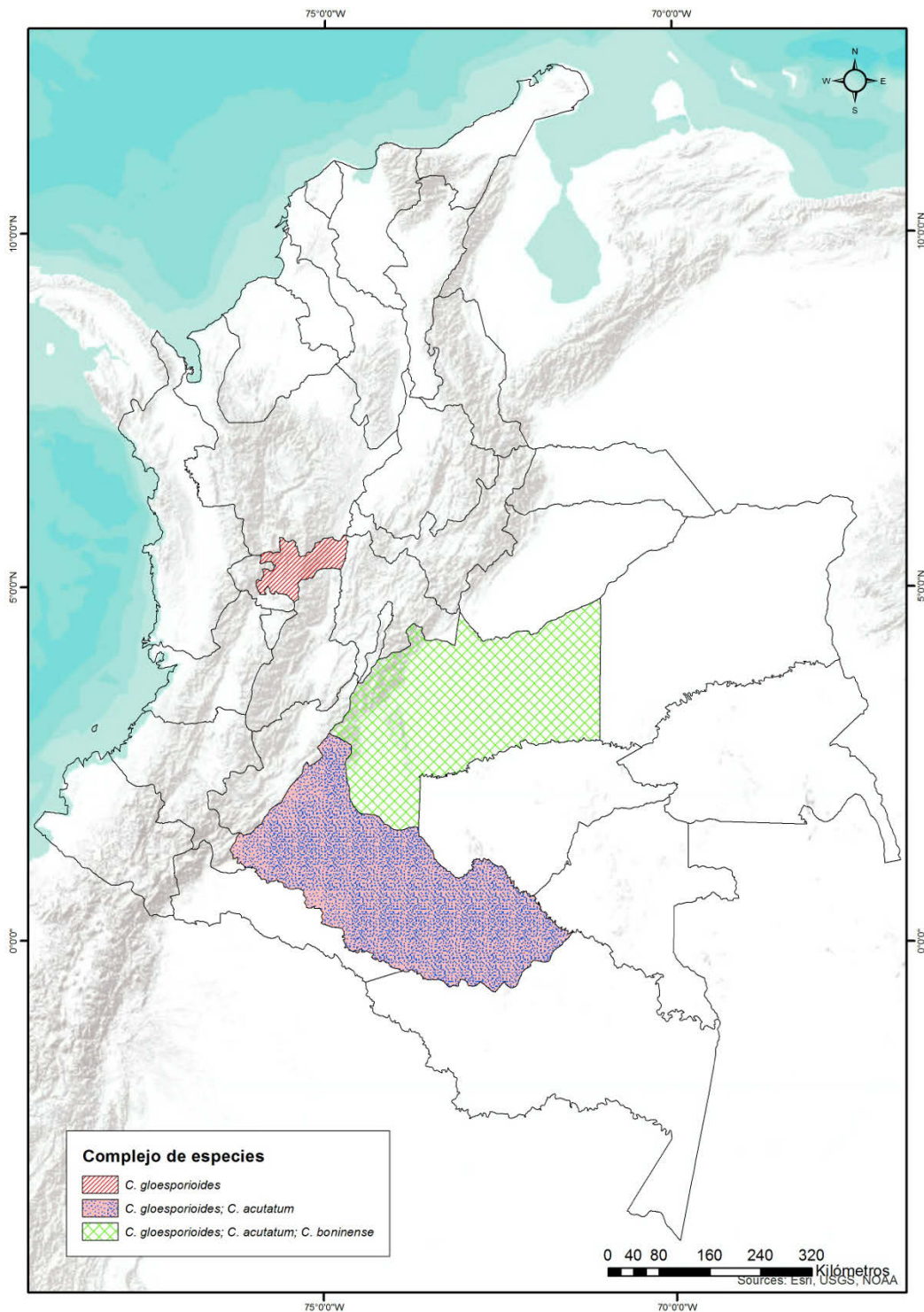
### **3.3 Identificación molecular de aislamientos de *Colletotrichum* spp.**

#### **3.3.1 Identificación a nivel de complejo de especies con cebadores específicos**

El cebador complejo-específico, *CgInt* utilizado en combinación con el ITS4, amplificó un

fragmento de ADN de 450 pb para 30 de los aislamientos y la cepa referencia de *C. gloeosporioides* s. *lat.*, GM29; en los aislamientos restantes no se obtuvo amplificación (Anexo E). El cebador complejo-específico *CaInt2* en combinación con el ITS4 amplificó un fragmento de ADN de 490 pb para 9 de los aislamientos evaluados y para el aislamiento referencia del complejo de *C. acutatum*, GM77. Aunque se presentaron algunas bandas inespecíficas y algunos aislamientos amplificaron doblemente con los cebadores de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, la intensidad de la banda amplificada permitió la definición del complejo (Anexo E). En el caso del cebador *Co1* utilizado en combinación con ITS4, sólo se obtuvo producto de amplificación para 1 de los aislamientos analizados y las cepas de referencia del complejo de *C. boninense*, GM01-L02, GM52-L01 y R033, dando como resultado un fragmento de 520 pb (Anexo E).

Trabajos adelantados por Bailey et al., (1992), Afanador et al., (2003), Álvarez et al., (2005) y Garrido et al., (2009), sugieren que el uso de primers específicos *CgInt*, *CaInt2* y *Co1*, combinados con el cebador ITS4 pueden ser utilizados para diferenciar *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*. Aunque los resultados obtenidos suministraron información sobre la determinación de complejos de especies de *Colletotrichum*, también sugieren falta de especificidad del cebador complejo-específico *CaInt2* con la presencia de bandas inespecíficas, y amplificaciones débiles para aislamientos amplificados fuertemente con *CgInt*. Estos resultados son consistentes con lo descrito por Salcedo (2013) quien afirma la falta de especificidad de éstos primers al amplificar cepas de *C. acutatum* y *C. boninense*, con bandas inespecíficas para otros aislamientos.



**Figura 3-2.** Complejos de especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a la Antracosis del Caucho Natural (*Hevea brasiliensis*) para tres núcleos productivos de Colombia.



Los resultados obtenidos indican a *C. gloeosporioides* como principal complejo asociado con la antracnosis del Caucho en Colombia, al estar presente en los 3 núcleos productivos seleccionados, Meta, Caldas, y Caquetá; seguido por el complejo *C. acutatum* presente en 2, Meta y Caquetá; y *C. boninense* sólo en 1, Meta (Figura 3-2; Anexo F). Lo anterior podría también ser relativo, debido a que el número de asilamientos por sitio no fue representativo, ni el mismo, para todas las zonas.

### 3.3.2 Filogenia de especies de *Colletotrichum* spp.

El análisis multilocus para diferentes genes en la diferenciación de especies de *Colletotrichum*, demuestra que los marcadores más eficientes en el diagnóstico son *TUB2* y *GAPDH*, debido a que el uso de genes que codifican proteínas y sus intrones a menudo tienen más variaciones que la región ITS (Cannon et al., 2012; Damm et al., 2012a; Damm et al., 2012b; Weir et al. 2012). En nuestro caso se obtuvieron productos de amplificación de PCR para la región completa del ITS-ADNr con 600 pb, y los genes *TUB2* de 500 pb, y *GADPH* con 300 pb (Anexo G). Cada producto de PCR fue limpiado y enviado a secuenciar. Los datos de secuencias de ADN fueron editados y analizados como se describe en la metodología.

El mejor modelo de sustitución de nucleótidos para el análisis bayesiano fue el Hasegawa-Kishino-Yano con distribución Gamma discreta (HKY + G) para los alineamientos multilocus obtenidos por complejo de especies de *Colletotrichum* (Anexos H-J). Este modelo fue seleccionado con base en los puntajes más bajos del Criterio de información Bayesiano (BIC) que describen el mejor patrón de sustitución. Otros valores también fueron considerados, el AICc (Criterio de información de Akaike, corregido), el valor de Máxima verosimilitud (lnL) y el número de parámetros (incluidas las longitudes de rama).

### 3.3.2.1 Complejo de especies *C. gloeosporioides*

Una vez realizada la concatenación de las secuencias de los genes *GAPDH*, *TUB2*, e *ITS*, se obtuvo un alineamiento de 1148 nucleótidos, de los cuales 780 fueron conservados, 287 sitios variables, 126 informativos para parsimonia y 172 “singlets”.

En la Figura 3-3 se presenta el árbol consenso obtenido del análisis de inferencia bayesiana de los aislamientos pertenecientes al complejo de especies “*gloeosporioides*”, el cual consistió de 30 aislamientos procedentes de diferentes zonas, 35 cepas de referencia que han sido previamente reportadas para las especies representativas, y como grupo externo (“Outgroup”) la cepa *Colletotrichum acutatum* CBS112996. Se identificaron 5 especies dentro del complejo asociadas a los aislamientos de estudio, con probabilidades posteriores bayesianas  $>0,8$ .

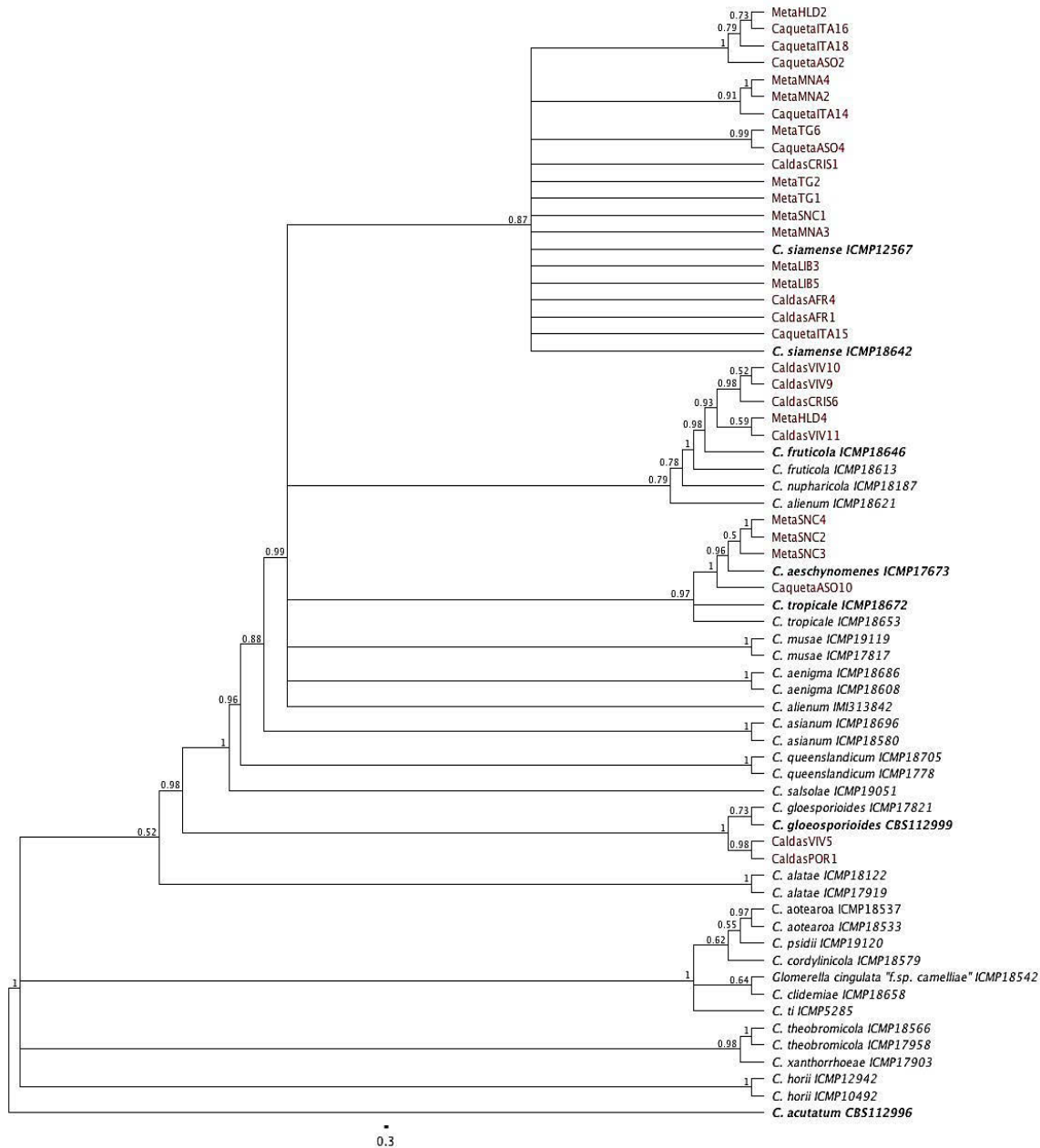
Los aislamientos procedentes de los tres núcleos productivos de Caucho, MetaHLD2, CaquetaITA16, CaquetaITA18, CaquetaASO2, MetaMNA4, MetaMNA2, CaquetaITA14, MetaTG6, CaquetaASO4, CaldasCRIS1, MetaTG2, MetaTG1, MetaSNC1, MetaMNA3, MetaLIB3, MetaLIB5, CaldasAFR4, CaldasAFR1 y CaquetaITA15, correspondientes al 50% de la población de estudio, se agruparon con una probabilidad posterior de 0,87 con las cepas de referencia ICMP12567 e ICMP18642 de la especie *C. siamense*. Según Wikee et al. (2011), *Colletotrichum siamense* fue descrito originalmente a partir de aislamientos obtenidos de plantas de café en Tailandia, no obstante, esta especie es biológica y geográficamente diversa, y se encuentra en muchos hospederos en varias regiones tropicales y subtropicales. Salcedo (2013), describe algunos aislamientos asociados a la antracnosis foliar en *H. brasiliensis* en Brasil que fueron identificados empleando filogenia molecular como *C. siamense* (Sara, 2013). Weir et al., (2012), reporta esta especie en el análisis de 30 aislamientos que formaron un clado monofilético, el cual no fue posible subdividir más, puesto que las secuencias ITS no lo separaron confiablemente de *C. fructicola* ó *C. tropicale*. Esta especie fue bien diferenciada con el análisis de la región *TUB2*.

Los aislamientos provenientes de Caldas y Meta, CaldasVIV10, CaldasVIV9, CaldasCRIS6, MetaHLD4 y CaldasVIV11, se agruparon en un clado bien resuelto con una probabilidad posterior de 0,93 junto con la especie *C. fructicola* ICMP18646. Esta especie es también biológica y geográficamente diversa; fue originalmente reportada de

granos de café en Tailandia, como endófito en varias plantas de América Central (Rojas et al., 2010; Weir et al., 2012) y en diversos hospederos de África, Europa y Australia (Weir, et al., 2012; Phoulivong, et al., 2012; Sharma & Shenoy, 2013; Jiang, et al., 2014). En Colombia, *C. fructicola* se ha reportado como agente causal de antracnosis en tallos de mora (*Rubus glaucus* B.) del ecotipo Castilla (Afanador-Kafuri, et al., 2014) y en frutos de aguacate cv. Hass (Gañan et al., 2015). Filogenéticamente esta especie fue bien diferenciada de las especies *C. aeshynomenes* y *C. siamense* empleando las regiones ITS, *TUB2* y *GADPH*, aunque también podrían emplearse regiones como la Glutamina sintasa (*GS*) o la Superóxido dismutasa (*SOD2*) (Weir et al., 2012).

Los aislamientos MetaSNC2, MetaSNC3, MetaSNC4, fueron agrupados con la cepa de referencia *C. aeshynomenes* ICMP17673, con una probabilidad posterior bayesiana de 0,95. Esta especie fue reportada en USA, Arkansas, en lesiones de *Aeshynomene virginica* y como biocontrolador de malezas (Collego) (Ditmore et al., 2008). Esta especie es también geográfica y biológicamente diversa y se ha reportado en una amplia gama de hospederos. Genéticamente es cercana a *C. siamense* y *C. tropicale*, y difiere morfológicamente de ellas al tener conidios ligeramente más largos, y apresorios fuertemente lobulados (Weir et al., 2012). Al igual que las especies ya mencionadas, las secuencias ITS no distinguen a *C. aeshynomenes* de *C. fructicola*. Estos taxones se distinguen mejor usando *TUB2*, *GAPDH* ó *GS* (Weir et al., 2012).

El aislamiento CaquetaASO10 se agrupó con las cepas de referencia *C. tropicale* ICMP18672 e ICMP18653, con una probabilidad posterior de 0,97. Rojas et al. (2010) reporta a *C. tropicale* aislado de una amplia gama de hospederos en bosques tropicales de América, en frutas, y como endófito foliar. *Colletotrichum tropicale* es genéticamente cercano a *C. siamense*, ambas especies comparten características morfológicas, como crecimiento lento en medio de cultivo, apresorios simples, conidios cortos y anchos con extremos ampliamente redondeados (Weir, et al., 2012). Las secuencias ITS no separan a *C. tropicale* de algunos aislados de *C. siamense* ó de algunos *C. queenslandicum*. Esta especie es bien diferenciada con las regiones *TUB2*, *CHS-1*, *GS* ó *SOD2* (Weir, et al., 2012).



**Figura 3-3.** Árbol filogenético consenso basado en inferencia bayesiana, ilustrando la relación entre los aislamientos de *Colletotrichum* en el complejo de especies "gloeosporioides". El árbol fue construido usando secuencias concatenadas de la región completa del ITS-ADNr y los genes *GDPH* y *TUB2*. *Colletotrichum acutatum* (CBS112996) fue usado como Outgroup. Los números presentes en cada clado representan las probabilidades posteriores.

Los aislamientos CaldasVIV5 y CaldasPOR1 se agruparon con la especie *C. gloeosporioides* ICMP112999 con probabilidad posterior igual a 1. El nombre *Colletotrichum gloeosporioides* es actualmente de uso común en dos sentidos, uno genético (especie) y otro biológicamente más amplio, conocido como el complejo de especies *C. gloeosporioides* s. lat. Weir et al., (2012), reporta a *Colletotrichum gloeosporioides* f. *heveae* originalmente descrito a partir de aislamiento de lesiones sobre hojas de plántulas de *Hevea brasiliensis* de Sri Lanka. De igual manera, Carpenter y Stevenson (1954) describen otras especies de *Colletotrichum*, *Gloeosporium* y *Glomerella* a partir del caucho, sinónimas de *C. gloeosporioides*. Las secuencias ITS separan bien a esta especie de las demás del complejo.

Las secuencias ITS, el gen oficial como código de barras para los hongos (Seifert, 2009; Schoch et al., 2012), no resuelve del todo las relaciones dentro del complejo *C. gloeosporioides* (Weir et al., 2012). La definición de especies fue posible sobre la base del análisis multilocus filogenético de las regiones empeladas *TUB2*, *GADPH*, *ITS*. El complejo de especies de *C. gloeosporioides* es un clado bien soportado con valores de probabilidad posterior bayesiana igual a 1 para 22 especies (Weir et al., 2012). Es muy diverso en términos de morfología e incluye una cantidad importante de patógenos de plantas (Cannon et al., 2012). Weir et al. (2012) identificaron los subclados Kahawae y Musae dentro de éste complejo de especies, que filogenéticamente están bien respaldados con base en los análisis multilocus de cepas “tipo” ó “auténticas”. El clado de Musae incluye las especies *C. fruticola*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C. siamense* y *C. tropicale*; y el clado Kahawae incluye *C. cordylinicola*, *C. psidii* y *C. kahawae*. Por lo cual, las especies identificadas asociadas al Caucho Natural pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides*, hacen parte del clado Musae.

### 3.3.2.2 Complejo de especies *C. acutatum*

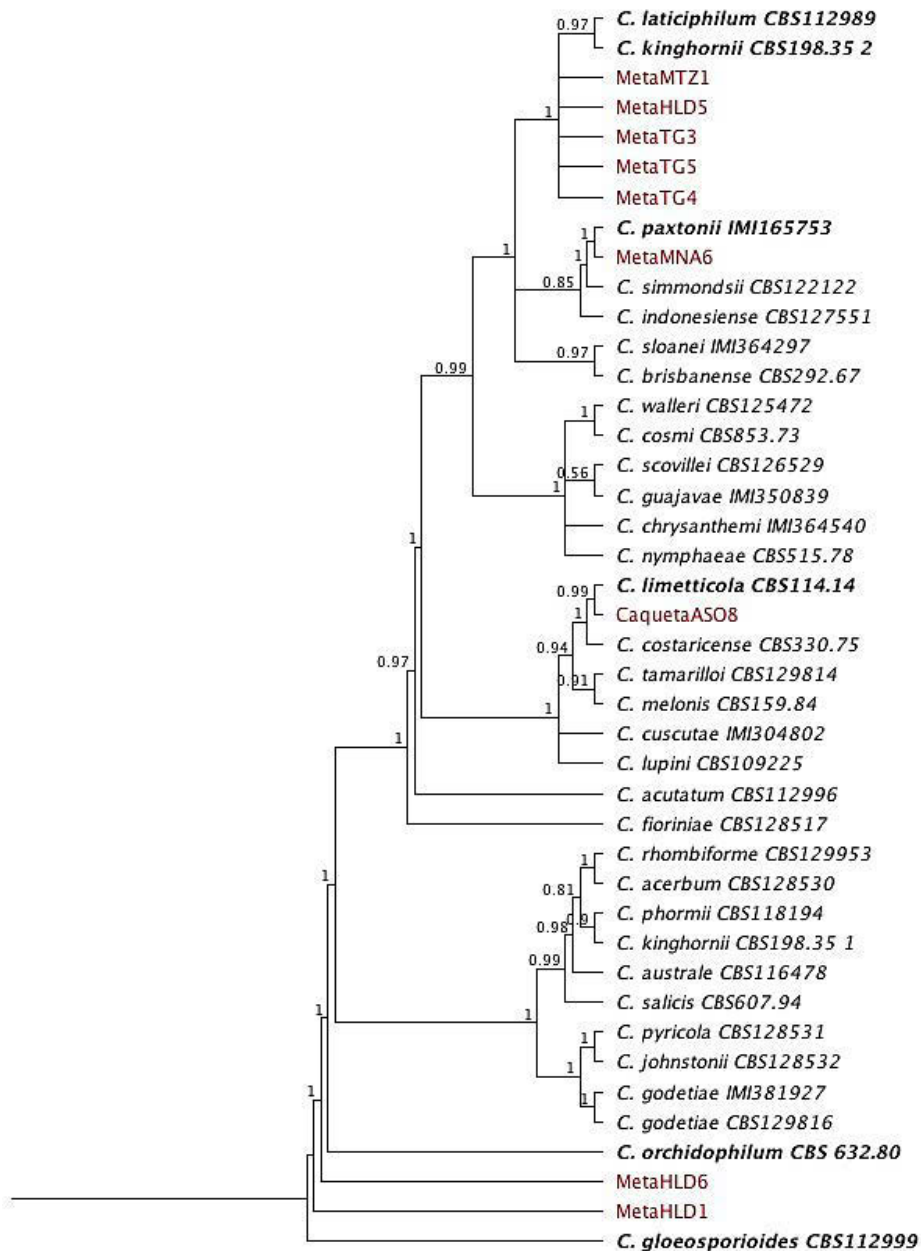
Una vez realizada la concatenación de las secuencias de los genes *GAPDH*, *TUB2*, e ITS, se obtuvo un alineamiento de 1055 nucleótidos, de los cuales 717 fueron conservados, 284 sitios variables, 116 informativos para parsimonia y 158 “singlets”.

En la Figura 3-4 se presenta el árbol consenso obtenido del análisis de inferencia bayesiana de los aislamientos pertenecientes al complejo de especies “*acutatum*”, el cual consistió de 9 aislamientos procedentes de Caucho Natural, adicionalmente a 31 cepas referencia que han sido previamente reportadas para las especies representativas; y como Outgroup la cepa *Colletotrichum gloeosporioides* CBS112999. Se identificaron 4 especies dentro del complejo asociadas a los aislamientos de estudio, con probabilidades posteriores bayesianas >0,8.

Los aislamientos MetaTG3, MetaTG4, MetaTG5, MetaHLD5, MetaMTZ1 fueron agrupados en un clado bien resuelto junto con dos cepas referencia de *C. laticiphilum* CBS112989 y *C. Kinghornii* CBS198352, con una probabilidad posterior bayesiana de 0,97. Para la determinación de especies, los aislamientos podrían relacionarse con *C. laticiphilum* cuya etimología, del griego *látex* = leche, y *philus* = afín; se refiere a su hospedero original el Caucho Natural. La enfermedad en la hoja ocasionada por *Colletotrichum* (*Colletotrichum* leaf disease, CLD) causa pérdidas y disminución del rendimiento en *Hevea brasiliensis* para el sudeste asiático (Brown y Soepena 1994; Jayasinghe et al., 1997; Saha et al., 2002). Al principio el patógeno se identificaba rutinariamente como *C. heveae* (Petch 1906) y luego se suponía que era *C. gloeosporioides* (s.lt.) (Carpenter & Stevenson 1954, von Arx 1957). Jayasinghe y sus colegas encontraron que la mayoría de las cepas examinadas de Sri Lanka pertenecían a *C. acutatum* (s.lt.). En Brasil aislamientos asociados a la antracnosis en *H. brasiliensis* fueron identificados como *C. laticiphilum* (Salcedo, 2013). Ésta especie es separada de otras por las secuencias *TUB2*, *GAPDH* y *CHS-1*.

El aislamiento MetaMNA6 se agrupó con la cepa de referencia *C. paxtonii* IMI165763 con una probabilidad posterior bayesiana igual a 1. Esta especie de *Colletotrichum* ha sido asociada con la especie *C. musae*; en uno de los clados principales del complejo de especies de *C. gloeosporioides* (Weir et al., 2012). En Damm et al., (2012b), una de las cepas analizadas como *C. paxtonii* fue estudiada por primera vez por Sherriff et al. (1994)

utilizando el nombre *C. musae*; sin embargo, Johnston y Jones (1997) confirmaron que era un miembro del complejo *C. acutatum*. Empleando *TUB2* y *GAPDH* fue posible diferenciar *Colletotrichum paxtonii* de otras especies.



**Figura 3-4.** Árbol filogenético consenso basado en inferencia bayesiana, ilustrando la relación entre los aislamientos de *Colletotrichum* en el complejo de especies "acutatum". El árbol fue construido usando secuencias concatenadas de la región completa del ITS-

ADNr y los genes GPDH y TUB2. *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS 112999) fue usado como Outgroup. Los números presentes en cada clado representan las probabilidades posteriores.

CaquetaASO8 se agrupó con una probabilidad de 0,99 con la cepa *C. limetticola* CBS114.14, inicialmente descrita como *Gloeosporium limetticola* por Clausen (1912) en ensayos de patogenicidad en *Citrus medica* var. Posteriormente, Damm et al. (2012a) denominaron *C. limetticola* a esta especie, a partir de aislados provenientes de Florida, y en Brasil se identificaron aislamientos de esta especie asociados a la antracnosis en *H. brasiliensis* (Salcedo, 2013). Sierra (2010) comprobó la patogenicidad de aislados provenientes de cítricos, los cuales fueron también patogénicos sobre folíolos de Caucho Natural. En el mismo estudio, se identificaron estos aislados como *C. acutatum* utilizando los cebadores específicos (Calnt2 + ITS4), aunque es posible que se trate de *C. limetticola*, ya que la especie se distingue de otras especies del mismo complejo mediante la utilización de *TUB2*, *GAPDH*, *HIS3* y más efectivamente con *TUB2* (Damm et al., 2012a; Salcedo, 2013).

Los aislamientos MetaHLD6 y MetaHLD1 se agruparon en un clado con la cepa de referencia *C. orchidophilum* CBS632.80, con probabilidad posterior igual a 1. Esta especie se utiliza como grupo externo en la filogenia del complejo *C. acutatum*. La especie está asociada a un rango de géneros en las Orchidaceae. De acuerdo con búsquedas exhaustivas con secuencias ITS, también se ha encontrado a *C. orchidophilum* en otras orquídeas en diferentes países: en *Cycnoches aureum* en Panamá (Farr et al., 2006), en *Pleione* sp. (Nirenberg et al., 2002) y como endófito de *Dendrobium nobile* en China (Yuan et al., 2009).

El complejo *Colletotrichum acutatum* se define como un colectivo de 29 especies estrechamente relacionadas con *C. orchidophilum*, como taxón hermano. Se pueden identificar dos subclados principales dentro del clado de *acutatum*, que contienen 19 y 9 especies respectivamente. Éste clado puede resolverse eficazmente usando solo datos de secuencias ITS; para este complejo la región *TUB2* demostró ser informativa en la determinación de especies (Cannon et al., 2012).



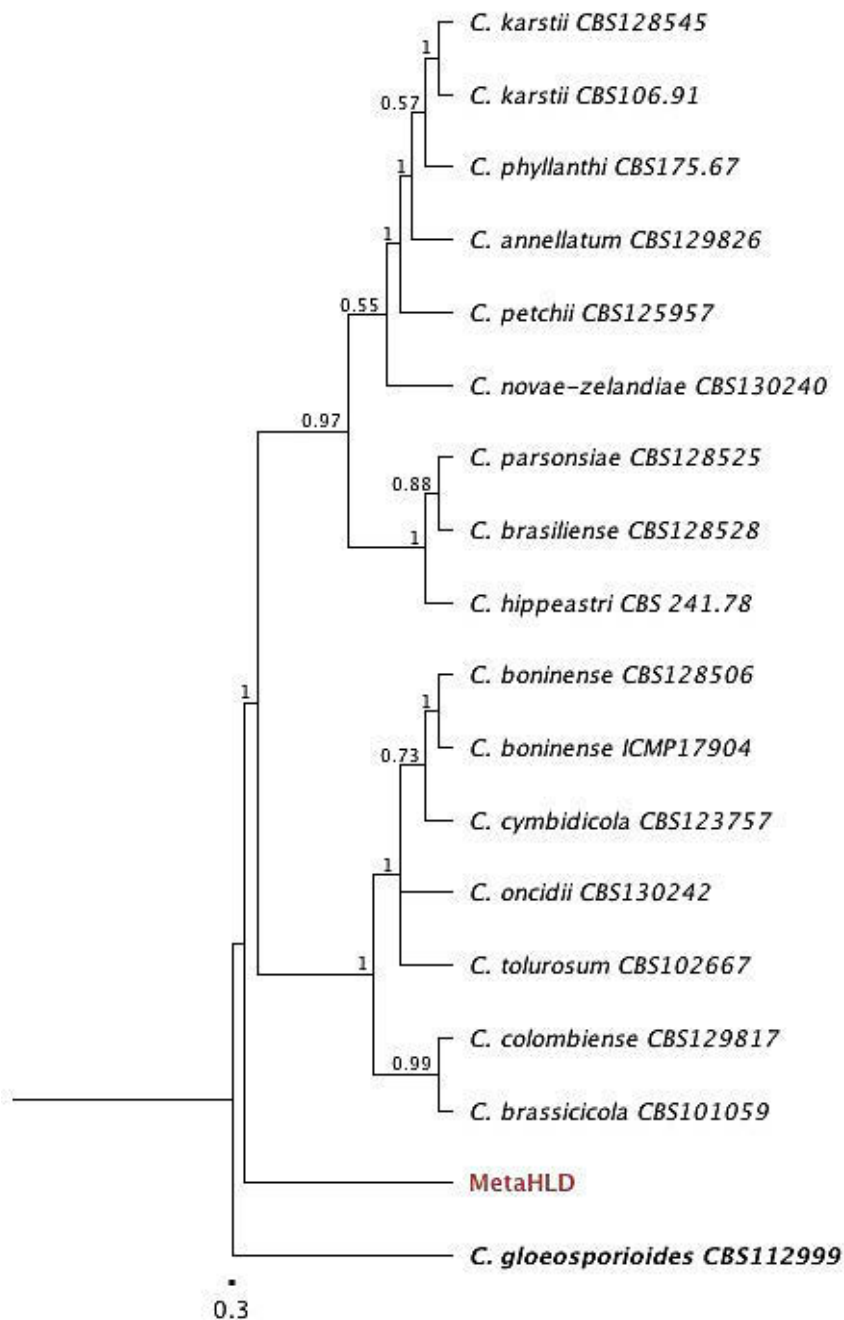
### 3.3.2.3 Complejo de especies *C. boninense*

Una vez realizada la concatenación de las secuencias de los genes *GAPDH*, *TUB2* e *ITS*, se realizó el alineamiento de 1040 nucleótidos, de los cuales 707 fueron conservados, 145 sitios variables, 280 informativos por parsimonia y 156 “singlets”.

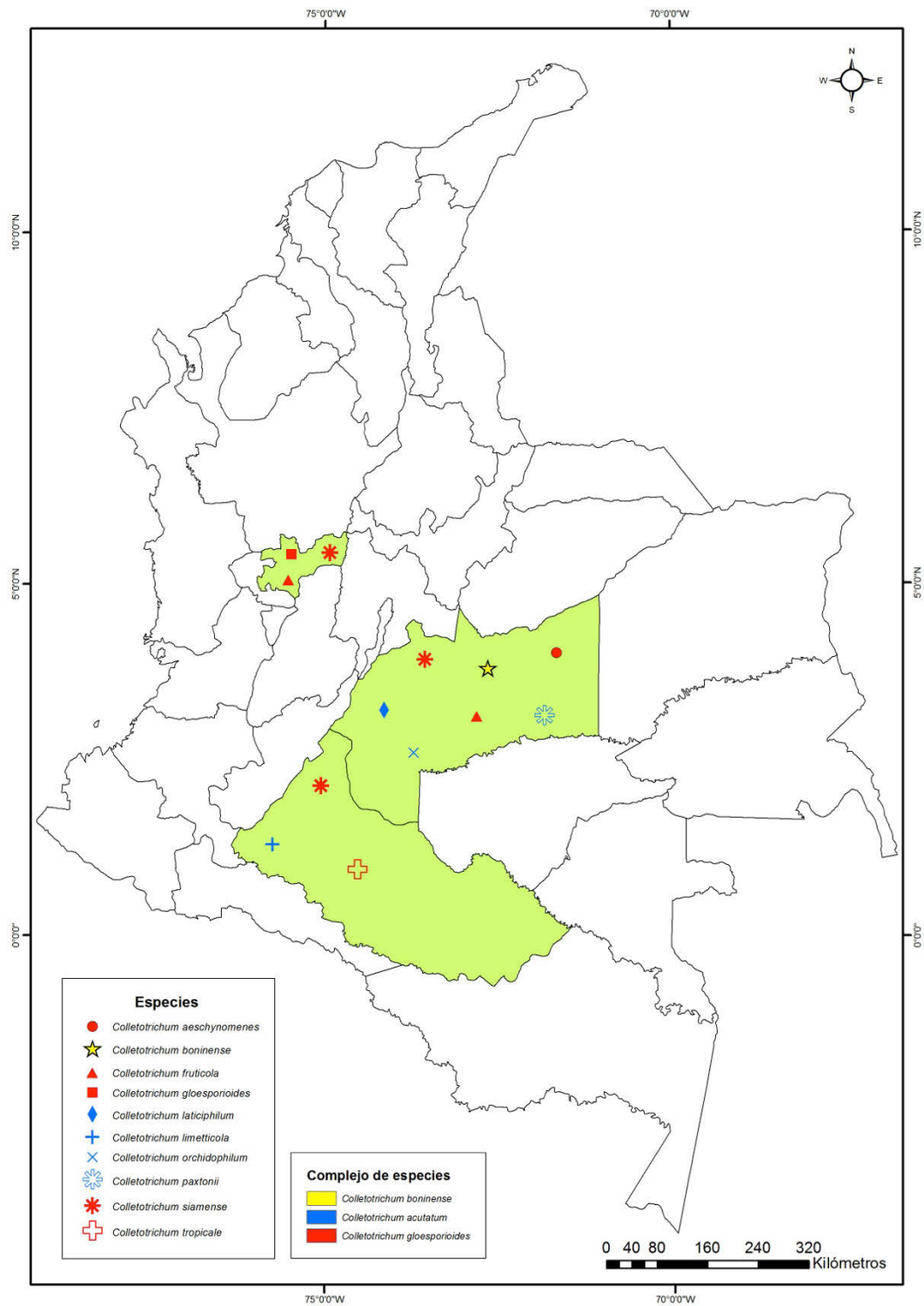
En la Figura 3-5 se presenta el árbol consenso obtenido del análisis de inferencia bayesiana de los aislamientos pertenecientes al complejo de especies “*boninense*”, el cual consistió de 1 aislamiento procedente de cultivos de caucho en Colombia con probabilidades posteriores bayesianas  $>0,8$ ; 16 cepas de referencia que han sido previamente reportadas para las especies representativas y como “Outgroup” la cepa *Colletotrichum gloeosporioides* CBS112999. Aunque el aislamiento MetaHLD resulto ser “especie indeterminado”, estuvo muy cercano a las secuencias de *C. colombiense*, que formó un grupo hermano con *C. brassicicola* aislado de pasifloras y especies de Brassica, respectivamente (Afanador-Kafuri, 2003; Damm et al, 2012b). La determinación de especies para este complejo podría haberse realizado con un análisis multilocus complementado con las regiones *ACT*, *CHS-1*, *HIS3* y *CAL*.

Con los resultados obtenidos, se identificaron 3 Complejos de especies de *Colletotrichum* afectando clones comerciales de Caucho en 3 núcleos productivos de esta especie en Colombia. El complejo *C. gloeosporioides*, representado con las especies *C. siamense*, *C. frutícola*, *C. laticiphilum*, *C. tropicale* y *C. gloeosporioides*; el Complejo *C. acutatum* con las especies *C. kinghornii*, *C. orchidophilum*, *C. paxtonii* y *C. limetticola*; y el complejo *C. boninense* (Figura 3-6).

La mayoría de aislados provenientes de *Hevea* sp. han sido considerados como pertenecientes a los complejos *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, especies descritas como agentes causales de la antracnosis foliar (Petch, 1921, Jayasinghe et al., 1997, Saha et al., 2002). Aunque más recientemente, se encontró un aislado proveniente de *H. guianensis* identificado en el complejo *C. boninense* (Gazis et al., 2011).



**Figura 3-5.** Árbol filogenético consenso con base en inferencia bayesiana, ilustrando la relación entre los aislamientos de *Colletotrichum* en el complejo de especies “*boninense*”. El árbol fue construido usando secuencias concatenadas de la región completa del ITS ADNr y los genes *GDPH* y *TUB2*. *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS 112999) fue utilizado como “Outgroup”. Los números presentes en cada clado representan las probabilidades posteriores.



**Figura 3-6.** Especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis del Caucho Natural (*Hevea brasiliensis*) para tres núcleos productivos de Colombia.

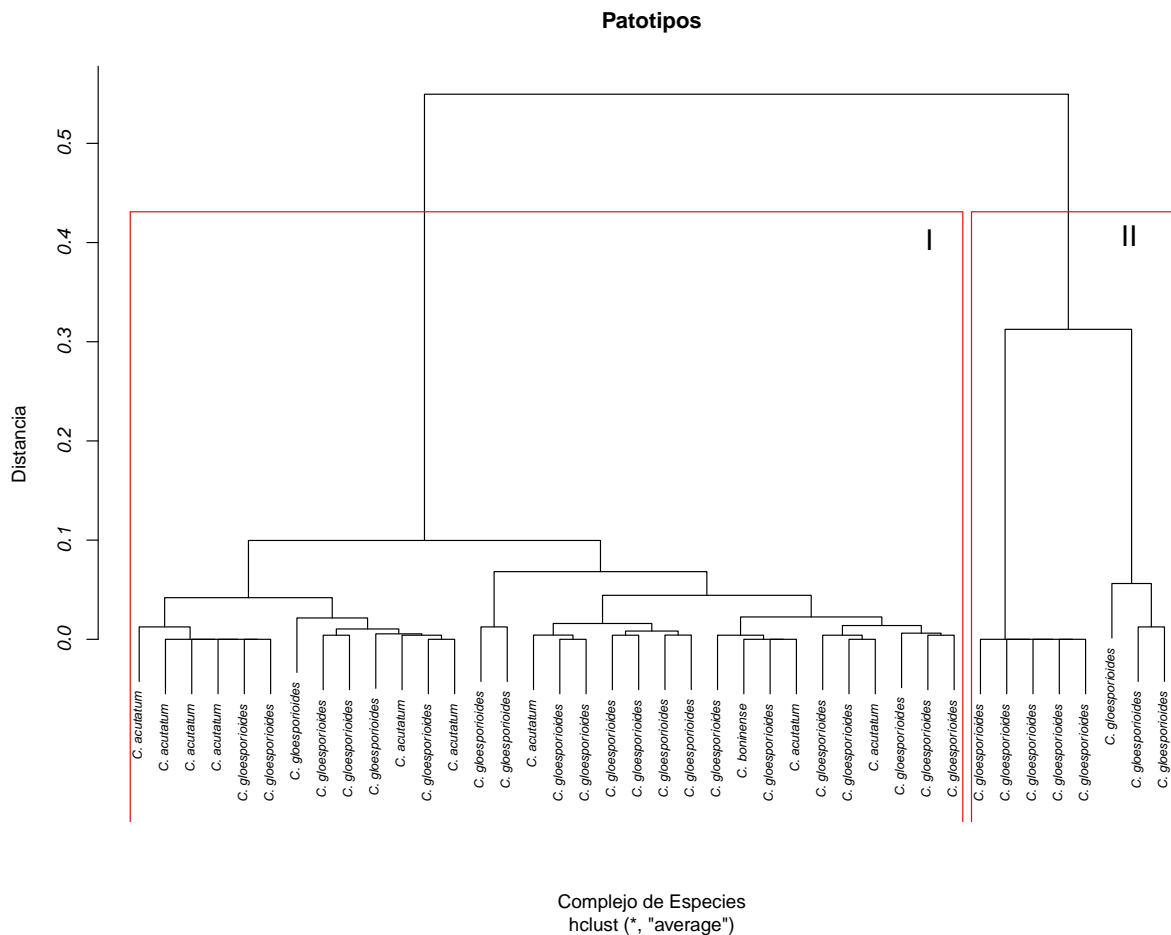
Las especies identificadas y caracterizadas en el presente estudio no presentaron un patrón de distribución geográfica o agrupación por nicho ecológico. Aislados de distintos orígenes geográficos presentaron agrupamiento en complejos similares, y aislados provenientes de la misma región se agruparon en diferentes complejos. Y aunque puede argüirse que la cantidad de sitios evaluados y el número de aislamientos por sitio no fue el mismo, es de esperar que con la ampliación del área de trabajo se encuentre mayor diversidad por sitio, confirmando la afirmación anterior.

Resultados similares fueron obtenidos por Meireles et al. (2009) y Salcedo (2013), donde aislados provenientes de diferentes hospederos y regiones geográficas distintas fueron distribuidos en un mismo grupo. Doyle et al. (2013), mencionan que factores genéticos, tanto del hospedero como del patógeno, ó ecológicos, pueden afectar el patosistema Caucho - *Colletotrichum* spp. y determinar la prevalencia de una especie sobre otra (s). Los estudios complementarios deben ser conducidos para entender cómo y por qué más de una especie puede causar epidemias en Caucho Natural (Salcedo, 2013).

### 3.3.3 Pruebas de Patogenicidad

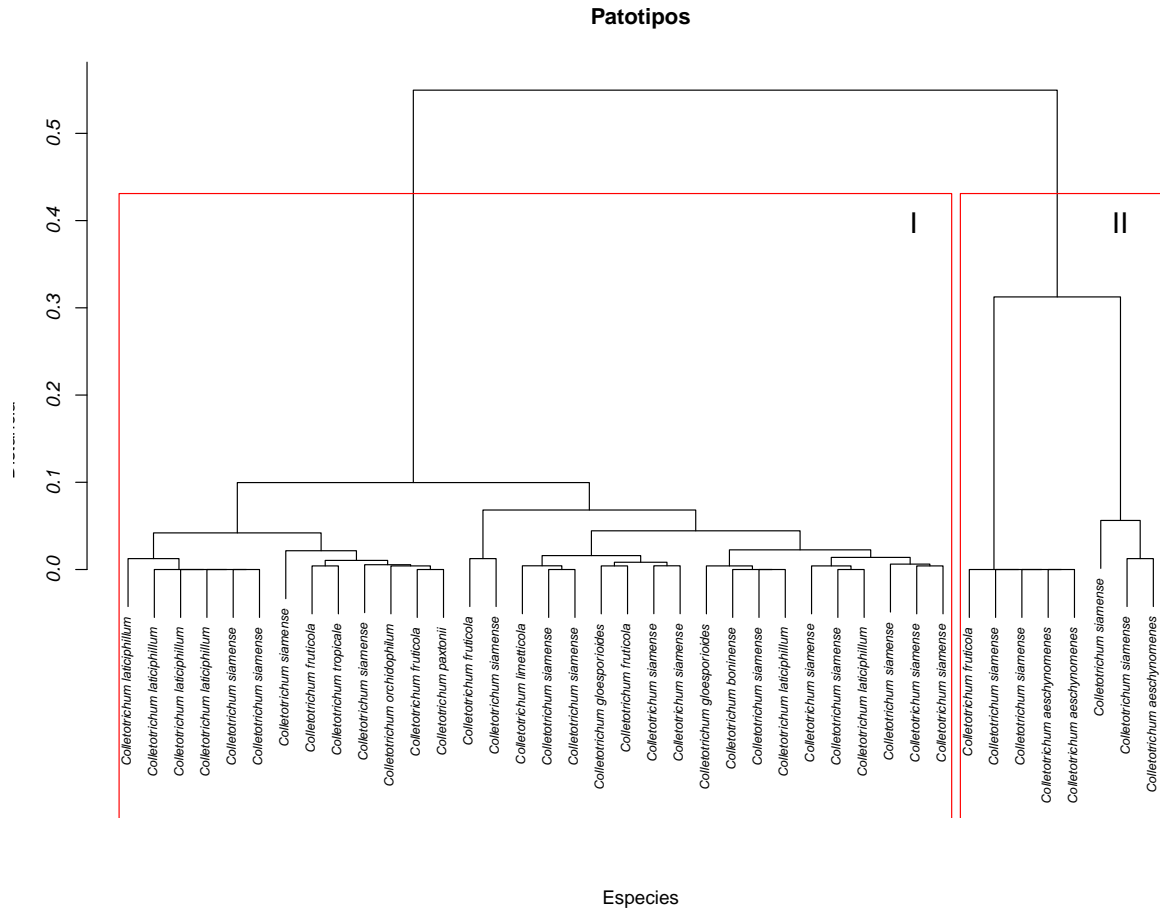
A partir del total de datos obtenidos sobre el progreso de la enfermedad, que comprendieron, periodo de incubación, presencia o ausencia de síntomas y signos del patógeno y tamaño de la lesión, se construyó una matriz de tipo mixto conformada por 2 tipos de variables (Anexo K): 1. Variables continuas: tamaño de la lesión y periodo de incubación; y 2. Variables binarias: presencia o ausencia de síntomas y signos.

El tratamiento de los datos con el coeficiente de similaridad y distancias de Gower; y la respectiva representación de agrupamientos por el método UPGMA, permitió un análisis apropiado de la matriz generada con variables de diferente naturaleza (Anexo K) y generó la discriminación de 2 patotipos diferentes para los aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos (Figuras 3-7 y 3-8).



**Figura 3-7.** Dendrograma construido por el método UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Gower de las variables de desarrollo de la enfermedad en complejos de especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis del Caucho Natural.

Las descripciones particulares para los 2 patotipos identificados dentro de la colección de *Colletotrichum* spp. obtenida se presentan en la Tabla 3-3. El Patotipo 1, se caracterizó por presentar periodos de incubación de 4 días, con presencia de síntomas y signos; y un tamaño medio de la lesión de 13,4 mm. Los aislamientos fueron nuevamente recuperados a partir de los síntomas generados y fueron comparados con los inicialmente inoculados. El análisis indicó similitud morfológica entre las colonias de los aislamientos inoculados y el reaislado de las lesiones desarrolladas en la prueba.



**Figura 3-8.** Dendrograma construido por el método UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Gower de las variables de desarrollo de la enfermedad de especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis del Caucho Natural.

El Patotipo 2 no desarrolló síntomas característicos de Antracnosis; sin embargo, se desarrollaron las colonias con los signos característicos del microorganismo, con presencia de micelio y masas conidiales.

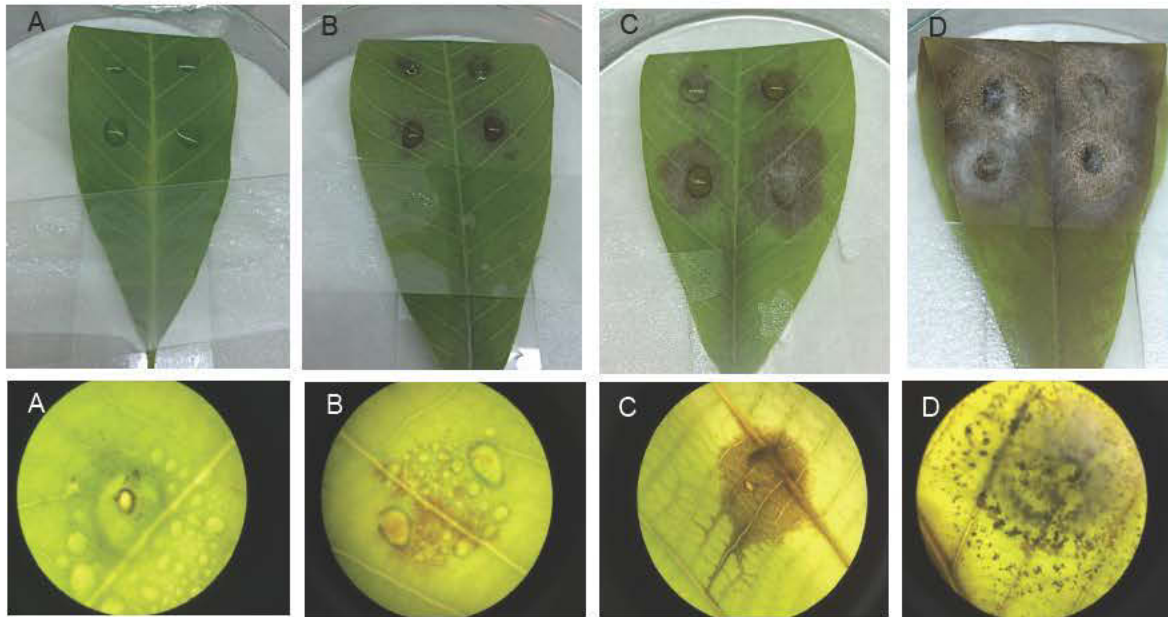
**Tabla 3-3.** Características de los patotipos discriminados mediante coeficiente de similitud de Gower.

Variable		Patotipo 1	Patotipo 2
Periodo de Incubación (días)	Mínimo/Máximo	0 - 4	0,0
	Media	4,0	0,0
Síntoma	Presencia/ausencia	0 y 1	0 y 1
	Mediana	1	0,0

<b>Tamaño de Lesión (mm)</b>	Mínimo/Máximo	8 - 20	0,0
	Media	13,4	0,0
<b>Signos del Patógeno</b>	Presencia/ausencia	0 y 1	0 y 1
	Mediana	1	1

Las especies identificadas en los 3 complejos de *Colletotrichum* analizados desarrollaron síntomas de la enfermedad sobre tejido inoculado con el patotipo 1 (Figura 3-9). No obstante, con el patotipo 2, algunos de los aislamientos identificados de las especies del complejo *C. gloeosporioides*, *C. fructicola*, *C. aeshynomenes* y *C. siamense* no desarrollaron síntomas. Lo anterior podría discutirse desde la perspectiva de los estilos de vida de *Colletotrichum* ó por pérdida de patogenicidad de los aislamientos debido a su antigüedad, almacenamiento y repique continuo en medios de cultivo.

Muchas de las especies identificadas en éste trabajo siguen siendo poco conocidas en términos de patogenicidad y preferencia (especificidad) por hospedero. Gazis et al, (2011), trabajó con especies endófitas del complejo *C. gloeosporioides* aisladas de *H. Brasiliensis* para determinar cómo la elección y el número de marcadores genéticos, influyen en las estimaciones de biodiversidad. Las diferencias en estilos de vida de las especies de *Colletotrichum* (necrotrófos, hemibiotrófos, latentes o quiescentes y endófitos) dependen de la especie *Colletotrichum*, la especie del hospedero, la madurez fisiológica del hospedero al momento de la infección y las condiciones ambientales (De Silva et al., 2017). Bajo esta consideración, el género *Colletotrichum* ofrece una oportunidad única para analizar diferentes patrones de vida proporcionando información útil sobre las interacciones planta-patógeno. Adicionalmente, la combinación de esta gama de estilos de vida, el hecho de que varias especies de *Colletotrichum* spp. puedan establecerse en un único hospedero; y la capacidad de la mayoría de estas especies para establecerse en un rango amplio de hospederos, han ocasionado una gran parte de la confusión que rodea los límites ecológicos de la actividad patogénica de éstas especies.



**Figura 3-9.** Progreso de la enfermedad en pruebas de patogenicidad para la especie *C. siamense*. **A.** Control, **B.** Aparición de síntomas, 4 días, **C.** Síntomas, 5 días, **D.** Signos del patógeno, 8 días.



## 4. Conclusiones

Los caracteres morfológicos del hongo no son suficientes para la clasificación y definición de taxas de *Colletotrichum* spp. La diversidad morfológica encontrada requiere el uso de técnicas moleculares complementarias que permitan la diferenciación de especies.

El uso de cebadores específicos *CgInt*, *CaInt2* y *CoI1* combinados con el ITS4, pueden ser utilizados para diferenciar *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*, respectivamente. Aunque los resultados obtenidos suministraron información sobre la determinación de complejos de especies, también sugieren falta de especificidad del cebador complejo-específico *CaInt2* debido a la presencia de bandas inespecíficas y amplificaciones débiles en aislamientos agrupados de forma concluyente con *CgInt*.

Los resultados obtenidos indican a *C. gloeosporioides* como principal complejo asociado con la antracnosis del Caucho en Colombia, consistentemente presente en los 3 núcleos productivos seleccionados (Meta, Caldas, y Caquetá); seguido por el complejo *C. acutatum* aislado en Meta y Caquetá; y *C. boninense* tan sólo en Meta. Se reitera el limitante derivado del tamaño del área evaluada, cuya implicación más evidente es que el panorama llegue a ampliarse, con la introducción de un mayor número de muestras.

El análisis filogenético permitió identificar la mayoría de aislamientos de *Colletotrichum* a nivel de especie. Se identificaron 10 especies de *Colletotrichum* afectando el clon más popular de Caucho a escala comercial en 3 núcleos productivos de Colombia. En el complejo *C. gloeosporioides* se determinaron las especies *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. laticiphilum*, *C. tropicale* y *C. gloeosporioides*; en el Complejo *C. acutatum*, las especies *C. laticiphilum*, *C. orchidophilum*, *C. paxtonii* y *C. limetticola*; y en el complejo *C. boninense*, un aislamiento especie indeterminada.

Aislados de distintos orígenes geográficos presentaron agrupamiento en complejos similares, y aislados provenientes de la misma región se agruparon en diferentes complejos. Las especies identificadas y caracterizadas en el presente estudio no

presentaron un patrón de distribución geográfica o agrupación por nicho ecológico. Y aunque puede argüirse que la cantidad de sitios evaluados y el número de aislamientos por sitio no fue el mismo, es de esperar que con la ampliación del área de trabajo se encuentre mayor diversidad por sitio, confirmando la afirmación anterior.

Los ensayos relativos a características morfológicas y de patogenicidad tradicionales sirvieron para recopilar información importante sobre los aislados. Los ensayos de patogenicidad en hojas desprendidas de Caucho, confirmaron la virulencia de todos los aislamientos obtenidos. No obstante, algunos aislamientos de las especies del complejo *C. gloeosporioides*: *C. fructicola*, *C. aeschynomenes* y *C. siamense* no desarrollaron síntomas típicos, probablemente por diferencias entre los estilos de vida de algunas especies de *Colletotrichum* spp. en condiciones naturales, o derivado de la antigüedad de aislamientos, condiciones de almacenamiento y repique continuo en medios de cultivo.

## 5. Recomendaciones

Uso de secuencias parciales de genes informativos como: Factor de Elongación 1 alpha (*EF-1 $\alpha$* ), actina (*ACT*), calmodulina (*CAL*), quitina sintasa (*CHS-1*), DNA liasa (*APN2*), glutamina sintetasa (*GS*) y manganeso superóxido dismutasa (*SOD2*), empleadas para el diagnóstico y la determinación de relaciones filogenéticas más detalladas entre poblaciones.

Las alternativas de manejo para la enfermedad en el campo podrían ser mejor estructuradas con base en estudios complementarios conducidos a la comprensión de cómo y por qué más de una especie puede causar epidemias en Caucho. Así como el uso estratégico de la diversidad del patógeno en la identificación de factores de resistencia genética y la selección de genotipos del hospedero.

Adicionalmente, análisis más sofisticados a partir de innovaciones recientes en genómica estructural y funcional, podrían facilitar una mejor comprensión de la estructura de las poblaciones en sus relaciones hospedero – patógeno, a partir del análisis de genomas completos.

## 6. Productos generados

**Eventos:** V Congresso Brasileiro de Heveicultura, Goiânia, Brasil.

**Póster:** “Diversidad Intraespecífica de las poblaciones de *Colletotrichum* spp. afectando caucho en Colombia”

**Premios:** Primer puesto entre 38 trabajos científicos presentados. V Congresso Brasileiro de Heveicultura, Goiânia, GO, Brasil:  
<http://www.congressodeheveicultura.com.br/>

### A. Anexo: Sitios muestreados para la identificación de especies de *Colletotrichum*.

Localidad	Plantación	Longitud*	Latitud*
Meta	Hacienda las Delicias	3,807806	-73,317543
	Agromontana	4,354949	-72,208985
	Tierra Grata	3,953476	-72,856281
	Matazul	4,153367	-72,640625
	San Carlos	4,189836	-72,532396
	C.I. La Libertad	4,058444	-73,467778
Caldas	Cristalinas	5,32675	-74,963167
	África	5,416028	-74,864222
	Vivero Ferka	5,32075	-74,909556
	El Porvenir	5,325222	-74,963583
Caquetá	Asoheca	1,531269	-75,476322
	Itarca	1,525847	-75,477731

\*Coordenadas planas.

### B. Anexo: Descripción de aislamientos empleados para la identificación de especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis en Caucho.

Localidad	Plantación	Aislamiento	Fecha de Colecta
Meta	Hacienda las Delicias	MetaHLD	2014
	Hacienda las Delicias	MetaHLD1	
	Hacienda las Delicias	MetaHLD2	
	Hacienda las Delicias	MetaHLD4	
	Hacienda las Delicias	MetaHLD5	
	Hacienda las Delicias	MetaHLD6	
	Agromontana	MetaMNA2	
	Agromontana	MetaMNA3	
	Agromontana	MetaMNA4	
	Agromontana	MetaMNA6	
	Tierra Grata	MetaTG1	
	Tierra Grata	MetaTG2	
	Tierra Grata	MetaTG3	

	Tierra Grata	MetaTG4	
	Tierra Grata	MetaTG5	
	Tierra Grata	MetaTG6	
	San Carlos	MetaSNC1	
	San Carlos	MetaSNC2	
	San Carlos	MetaSNC3	
	San Carlos	MetaSNC4	
	C.I. La Libertad	MetaLIB3	
	C.I. La Libertad	MetaLIB5	
	Matazul	MetaMTZ1	
<b>Caldas</b>	Cristalinas	CaldasCRIS1	2016
	Cristalinas	CaldasCRIS6	
	Africa	CaldasAFR1	
	Africa	CaldasAFR4	
	Vivero Ferka	CaldasVIV5	
	Vivero Ferka	CaldasVIV9	
	Vivero Ferka	CaldasVIV10	
	Vivero Ferka	CaldasVIV11	
	El Porvenir	CaldasPOR1	
<b>Caquetá</b>	Asoheca	CaldasASO2	2015
	Asoheca	CaldasASO4	
	Asoheca	CaquetaASO8	
	Asoheca	CaquetaASO10	
	Itarca	CaquetaITA14	
	Itarca	CaquetaITA15	
	Itarca	CaquetaITA16	
	Itarca	CaquetaITA18	

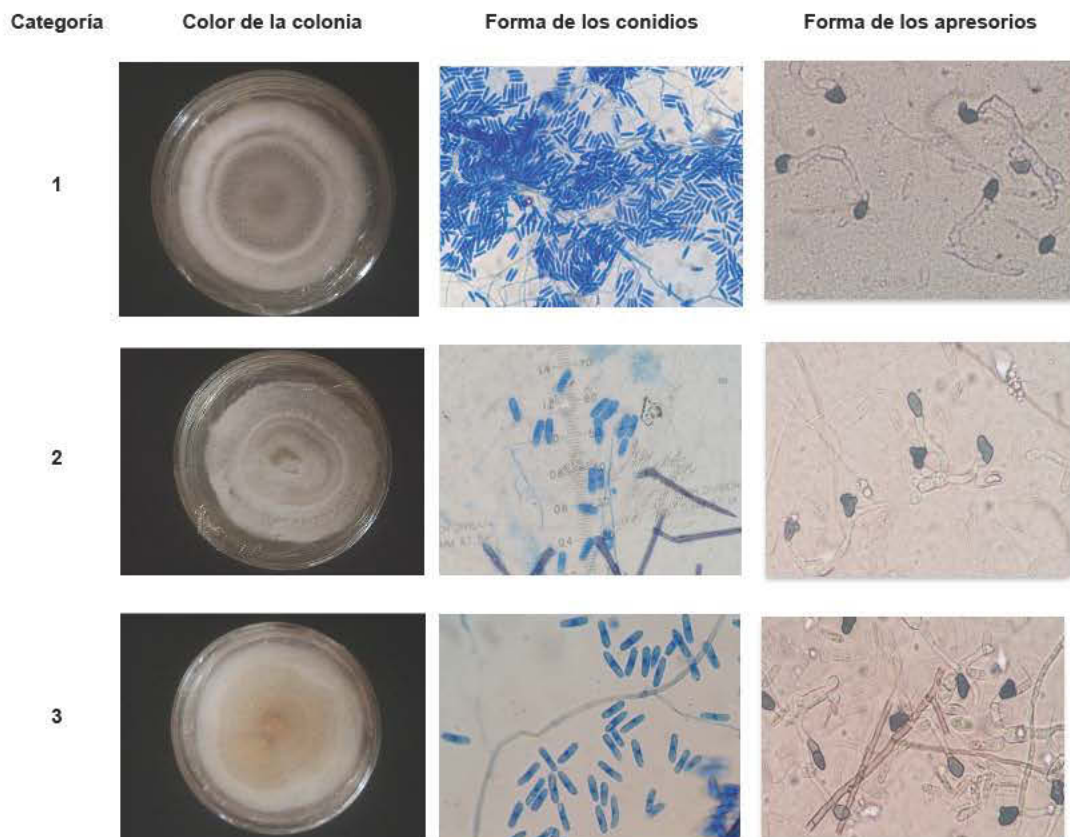
### C. Anexo: Matriz mixta de variables morfológicas empleadas para la caracterización aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Aislamiento	Crecimiento mm/día	Color colonia	Acervulos P/A	Forma conidios	Forma apresorios	Conidios largo	Conidios ancho	Apresorios largo	Apresorios ancho
MetaHLD	8,037	2	0	2	1	10,192	3,536	13,936	6,552
MetaHLD1	3,519	2	0	3	2	9,256	3,744	12,532	6,864
MetaHLD2	7,444	4	1	4	5	12,584	3,068	11,024	7,02
MetaHLD4	8,444	4	1	4	5	13,052	2,6	10,556	6,76
MetaHLD5	7,593	2	0	4	4	14,924	2,6	10,816	6,916

MetaHLD6	7,815	1	1	4	5	16,276	2,756	11,752	7,02
MetaMNA2	6,926	1	0	4	4	13,52	3,12	7,02	4,42
MetaMNA3	7,222	2	0	4	4	10,608	3,016	12,532	6,708
MetaMNA4	8,296	1	1	4	2	11,752	2,964	12,688	4,784
MetaMNA6	6,704	1	1	1	3	12,428	3,276	12,688	6,292
MetaTG1	2,778	2	1	4	3	12,584	3,276	10,608	4,888
MetaTG2	7,037	4	0	3	1	10,816	3,432	10,296	6,604
MetaTG3	6,852	2	0	3	2	8,788	3,172	11,492	4,108
MetaTG4	6,778	2	1	3	2	11,7	3,38	18,72	5,46
MetaTG5	2,593	4	0	4	4	11,804	3,12	15,444	5,616
MetaTG6	4,185	3	0	1	4	9,62	3,432	12,376	5,98
MetaSNC1	5,815	1	0	3	4	10,764	3,484	11,128	6,136
MetaSNC2	7,926	1	1	3	5	9,672	3,588	10,608	4,836
MetaSNC3	8,407	2	1	2	5	9,828	3,536	12,584	5,096
MetaSNC4	8,407	1	1	1	5	9,568	3,38	11,96	6,292
MetaLIB3	3,815	2	0	4	4	11,076	3,38	10,244	5,824
MetaLIB5	8,741	1	1	1	2	9,672	3,432	11,18	6,812
MetaMTZ1	8,704	2	0	3	4	15,08	3,484	10,66	4,784
CaldasCRIS1	7,259	2	1	2	3	12,428	3,432	10,504	5,876
CaldasCRIS6	8,296	1	0	3	1	8,58	3,432	9,984	5,772
CaldasAFR1	8,593	1	0	3	2	9,62	3,172	10,192	5,096
CaldasAFR4	8,000	3	0	1	4	9,412	3,276	11,544	4,94
CaldasVIV5	7,889	4	1	4	2	9,152	2,756	10,4	5,616
CaldasVIV9	8,704	2	1	2	2	9,672	2,964	10,296	5,148
CaldasVIV10	7,630	2	1	4	5	9,1	4,004	10,504	5,46
CaldasVIV11	8,148	1	0	4	4	9,776	3,068	14,04	5,668
CaldasPOR1	7,037	5	0	5	4	11,96	3,536	11,024	4,576
CaldasASO2	8,333	5	1	5	5	9,464	3,068	9,828	5,46
CaldasASO4	7,926	2	1	5	5	9,464	3,484	10,244	4,992

CaquetaASO8	7,963	1	1	5	3	8,996	3,64	10,504	4,836
CaquetaASO10	2,222	2	1	2	3	10,868	3,744	10,14	4,836
CaquetaTA14	8,370	3	0	5	4	9,1	2,6	10,296	5,044
CaquetaTA15	8,741	1	1	5	5	10,14	2,756	10,66	5,772
CaquetaTA16	5,593	3	1	5	5	9,62	2,912	10,036	5,98
CaquetaTA18	7,741	1	1	5	2	12,168	3,016	11,128	5,668

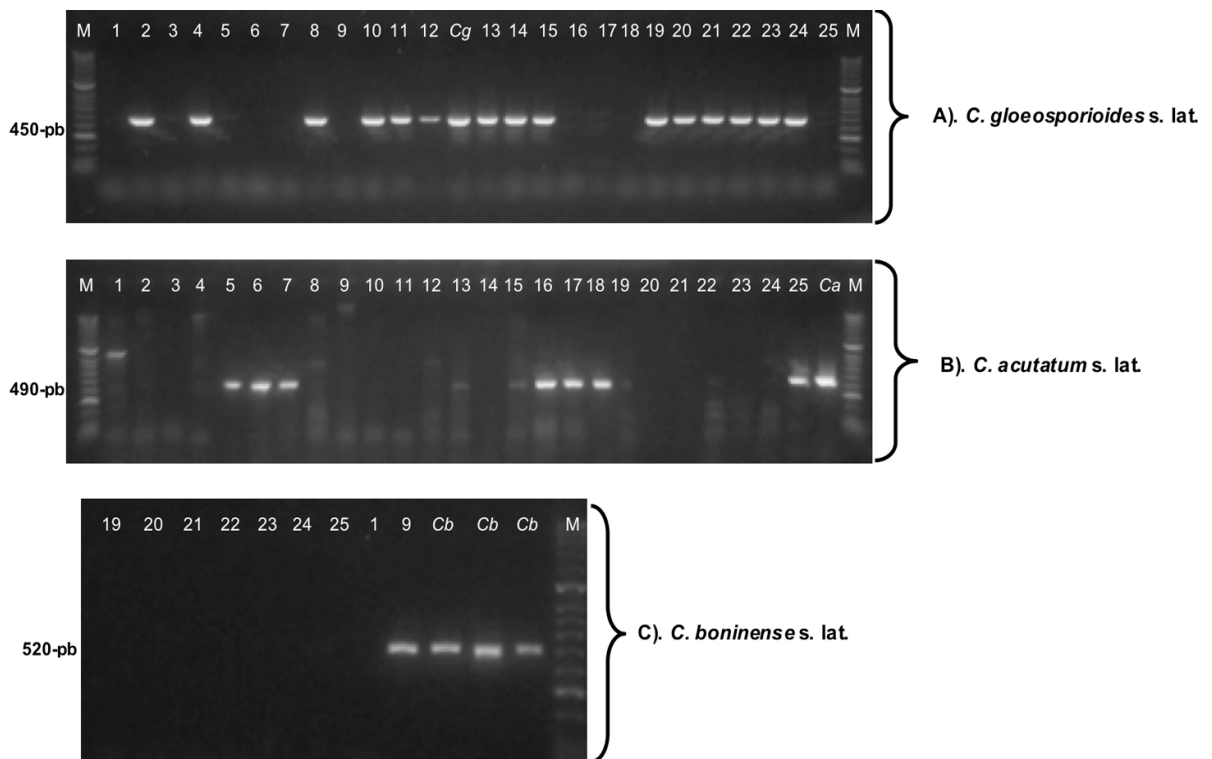
#### D. Anexo: Categorías morfológicas 1, 2 y 3 empleadas para la caracterización aislamientos de *Colletotrichum* spp.





## E. Anexo. Identificación taxa complejo-específica para 25 aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos en plantaciones de Caucho Natural, con base en la región ITS ADNr.

**A.** Complejo *C. gloeosporioides*, cebadores CgInt-ITS4. **B.** Complejo *C. acutatum*, cebadores CaInt2-ITS4. **C.** Complejo *boninense*, cebadores Col1-ITS4. Carril M: marcador de peso molecular HyperLadder™ II (Bioline); **A-B.** Carriles 1-25: plantilla de ADN con aislamientos de *Colletotrichum* spp.; Cg y Ca: plantilla de ADN con aislamientos de referencia para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, respectivamente. **C.** Carril 19-25, 1 y 9: plantilla de ADN con aislamientos de *Colletotrichum* spp.; Carriles Cb: plantilla de ADN con aislamientos de referencia para *C. boninense*.



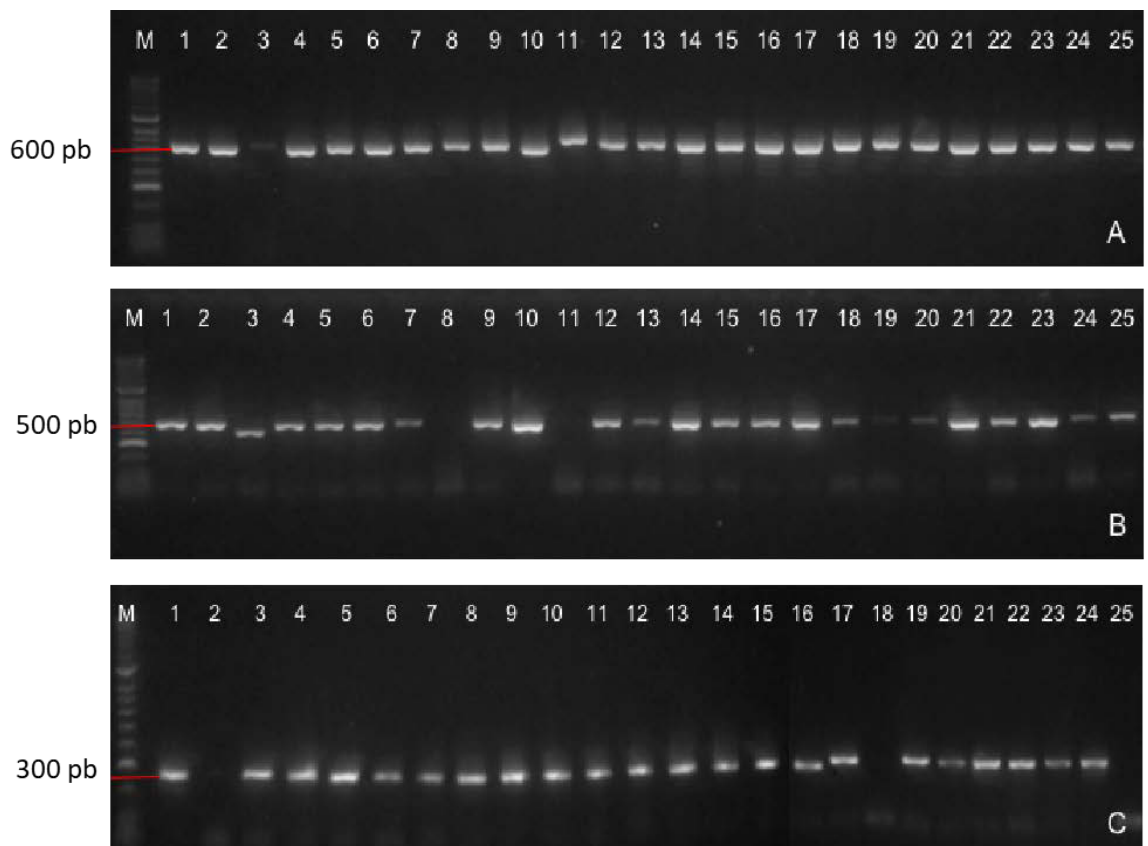
## F. Anexo: Descripción para complejos de especies de *Colletotrichum* asociadas a la Antracnosis del Caucho.

Localidad	Plantación	Aislamiento	Complejo de <i>Colletotrichum</i>
Meta	Hacienda las Delicias	MetaHLD2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
	Hacienda las Delicias	MetaHLD4	
	Agromontana	MetaMNA2	
	Agromontana	MetaMNA3	
	Agromontana	MetaMNA4	
	Tierra Grata	MetaTG1	
	Tierra Grata	MetaTG2	
	Tierra Grata	MetaTG6	
	San Carlos	MetaSNC1	
	San Carlos	MetaSNC2	
	San Carlos	MetaSNC3	
	San Carlos	MetaSNC4	
	C.I. La Libertad	MetaLIB3	
	C.I. La Libertad	MetaLIB5	
Caldas	Cristalinas	CaldasCRIS1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
	Cristalinas	CaldasCRIS6	
	África	CaldasAFR1	
	África	CaldasAFR4	
	Vivero Ferka	CaldasVIV5	
	Vivero Ferka	CaldasVIV9	
	Vivero Ferka	CaldasVIV10	
	Vivero Ferka	CaldasVIV11	
	El Porvenir	CaldasPOR1	
Caquetá	Asoheca	CaldasSO2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
	Asoheca	CaldasASO4	
	Asoheca	CaquetaASO10	
	Itarca	CaquetaITA14	
	Itarca	CaquetaITA15	
	Itarca	CaquetaITA16	
	Itarca	CaquetaITA18	
Meta	Hacienda las Delicias	MetaHLD1	<i>Colletotrichum acutatum</i>
	Hacienda las Delicias	MetaHLD5	
	Hacienda las Delicias	MetaHLD6	
	Agromontana	MetaMNA6	
	Tierra Grata	MetaTG3	
	Tierra Grata	MetaTG4	

	Tierra Grata	MetaTG5	
	Matazul	MetaMTZ1	
Caquetá	Asoheca	CaquetaSO8	
Meta	Hacienda las Delicias	MetaHLD	<i>Colletotrichum boninense</i>

## G. Anexo: Productos de amplificación de PCR.

A. ITS-ADNr y las regiones B. TUB2 y C. GADPH, obtenidos con el par de cebadores ITS4/ITS5, Bt2a/Bt2b y GDF1/GDR1, respectivamente. Carriles 1-25: plantilla de ADN de aislamientos de *Colletotrichum* spp.; Carril M: Marcador de peso molecular HyperLadder II (Bioline).



## H. Anexo: Selección del mejor modelo de sustitución de nucleótidos complejo *C. gloeosporioides*.

Model	#Param	BIC	AICc
HKY+G	160	12118,4096	10715,01134
HKY+G+I	161	12129,1887	10717,02596
TN93+G+I	162	12136,04919	10715,12205
TN93+G	161	12136,66121	10724,49847
K2+I	157	12150,89067	10773,78635

\* HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor. La no uniformidad de las tasas evolutivas entre los sitios se puede modelar mediante el uso de una distribución Gamma discreta (+ G) con 5 categorías de tasas y suponiendo que una determinada fracción de los sitios son evolutivamente invariables (+ I)

## I. Anexo: Selección del mejor modelo de sustitución de nucleótidos complejo *C. acutatum*.

Model	#Param	BIC	AICc
HKY+G	104	14628,55088	13716,12608
TN93+G	105	14637,96556	13716,77184
HKY+G+I	105	14639,32965	13718,13593
TN93+G+I	106	14660,71823	13730,75568
GTR+G	108	14663,11873	13715,61877

\* GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei. La no uniformidad de las tasas evolutivas entre los sitios se puede modelar mediante el uso de una distribución Gamma discreta (+ G) con 5 categorías de tasas y suponiendo que una determinada fracción de los sitios son evolutivamente invariables (+ I)

## J. Anexo: Selección del mejor modelo de sustitución de nucleótidos complejo *C. boninense*

Model	#Param	BIC	AICc
HKY+G	56	10890,84173	10436,12347
TN93+G	57	10897,08375	10434,25011
HKY+G+I	57	10900,96628	10438,13264
TN93+G+I	58	10907,2087	10436,25984
GTR+G	60	10918,88104	10431,70224

\* GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei. La no uniformidad de las tasas evolutivas entre los sitios se puede modelar mediante el uso de una distribución Gamma discreta (+ G) con 5 categorías de tasas y suponiendo que una determinada fracción de los sitios son evolutivamente invariables (+ I)

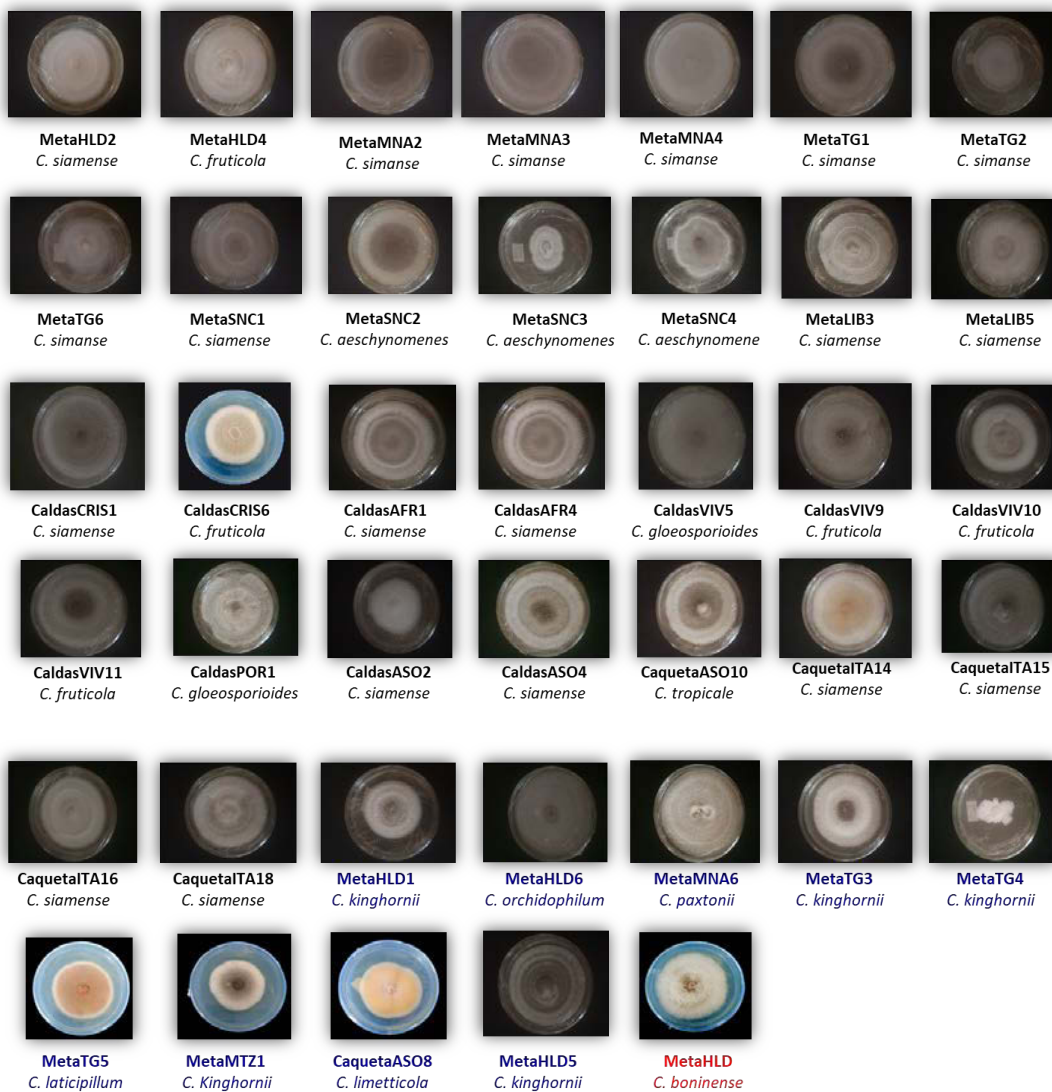
## K. Anexo. Matriz mixta de variables de desarrollo de la enfermedad empleadas para la caracterización aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Aislamiento	Complejo de <i>Colletotrichum</i>	Especie	PI (días)	Síntoma P/A	Lesión (mm)	Signos P/A
MetaHLD2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	8,67	1
MetaHLD4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum fructicola</i>	4	1	5,67	1
MetaMNA2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	12,67	1
MetaMNA3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	10,33	1
MetaMNA4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	7,67	1
MetaTG1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	4,67	1
MetaTG2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	9,00	1
MetaTG6	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	0	1	3,00	1
MetaSNC1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	0	1	8,00	1
MetaSNC2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum aeshynomenes</i>	0	1	4,00	1
MetaSNC3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum aeshynomenes</i>	0	0	0,00	1
MetaSNC4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum aeshynomenes</i>	0	0	0,00	1
MetaLIB3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	8,00	1
MetaLIB5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	0	0	0,00	1
CaldasCRIS1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	0	0	0,00	1
CaldasCRIS6	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum fructicola</i>	0	0	0,00	1
CaldasAFR1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	15,00	1
CaldasAFR4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	9,33	1
CaldasVIV5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	4	1	12,00	1
CaldasVIV9	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum fructicola</i>	4	1	17,00	1
CaldasVIV10	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum fructicola</i>	4	1	16,33	1
CaldasVIV11	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum fructicola</i>	4	1	11,67	1
CaldasPOR1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	4	1	10,00	1
CaldasSO2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	12,33	1
CaldasASO4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	17,33	1
CaquetaASO10	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum tropicale</i>	4	1	16,00	1
CaquetaITA14	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	13,33	1
CaquetaITA15	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	13,33	1
CaquetaITA16	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	20,00	1
CaquetaITA18	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	4	1	20,00	1
MetaHLD1	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum kinghornii</i>	4	1	20,00	1
MetaHLD5	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum kinghornii</i>	4	1	20,00	1
MetaHLD6	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	4	1	16,67	1
MetaMNA6	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum paxtonii</i>	4	1	17,00	1

MetaTG3	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum kinghornii</i>	4	1	20,00	1
MetaTG4	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum kinghornii</i>	4	1	19,00	1
MetaTG5	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum kinghornii</i>	4	1	8,00	1
MetaMTZ1	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum kinghornii</i>	4	1	10,33	1
MetaHLD	<i>Colletotrichum boninense</i>	<i>Colletotrichum boninense</i>	4	1	10,00	1

## L. Anexo: Macroscopía de aislamientos asociados a la Antracnosis en Caucho Natural (*Hevea brasiliensis*).

\*Negro: Complejo *C. gloeosporioides*; Azul: Complejo *C. acutatum*; Rojo: Complejo *C. boninense*.



## Bibliografía

Abang M., Winter S., Mignouna H., Green K. and Asiedu R. 2003. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp. 486-496.

Afanador-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. *Phytopathology* 93:579-587.

Afanador-Kafuri, L., González, A., Gañán, L., Mejía, J.F., Cardona, N., Álvarez, E. 2014. Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Disease*. 98 (11): 1503-1513.

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

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*). *Fitopatología Colombiana*. 28(1):1-8

Arias B. y Carrizales L. 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio Cedeño, Estado de Monagas, Venezuela. *Bioagro* 19 (1): 19-25.

Arroyo, F.T., Moreno, J., Garcia-Herdugo, G., Santos, B. D. I., Barrau, C., Porras, M., Blanco, C., Romero, F., 2005. Ultra- structure of the early stages of *Colletotrichum acutatum* infection of strawberry tissues. *Can. J. Bot.* 83, 491-500.

Bailey J.A. y Jeger M.J. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. British Society for plant Pathology.

Bernstein B., Zehr E., Dean R., and Shabi E. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts, *Plant Dis.* 70:478-482.

- Brown AE, Soepena H. 1994. Pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* on leaves of *Hevea* spp. *Mycological Research* 98: 264– 266.
- Brown AE., Sreenivasaprasad S., Timmer LW.1996. Molecular characterization of slow growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86:523-527.
- Busby, P.E., Ridout, M., Newcombe, G. 2016. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Mol. Biol.* 90, 645e655.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in mycology* 73, 181-213.
- Carpenter JB, Stevenson JA. 1954. A secondary leaf spot of the *Hevea rubber* tree caused by *Glomerella cingulata*. *Plant Disease Reporter* 38: 494–499.
- Cerón L., Higuera B., Sánchez J., Bustamante S. and Buitrago G. 2006. Growth and Development of *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* During Culture in Liquid Medium. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 11 No. 1, p. 99-109.
- Clausen RE.1912. A new fungus concerned in whiter tip of varieties of *Citrus medica*. *Phytopathology* 2: 217–236.
- Compagnon, P. 1998. El caucho natural, biología - cultivo - producción. Consejo Mexicano del Hule – CIRAD. México, D. F. 701 p.
- Brown, A, E., Soepena, H. 1994. Pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves of *Hevea* spp, *Mycol, Res*, 98 (3), 264–266.
- CONIF. 1997. Avances investigativos en caucho natural, Serie técnica No 37, 158p.
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW (2012a) The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73:37-113.
- Damm U. Cannon PF. Woudenberg JHC. Johnston PR. Weir BS (2012b) *The Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73:1- 36.
- De Silva D., Crous P., Ades P., Hide K. And Taylor P. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. 2017. *Fungal biology, Reviews* 31, 55-168
- 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.

Dingley JM, Gilmour JW. 1972. *Colletotrichum acutatum* Simms. f. sp. *pineum* associated with terminal crook disease of *Pinus* spp. New Zealand Journal of Forestry Science 2: 192–201.

Ditmore M, Moore JW, TeBeest DO. 2008. Interactions of two selected field isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* on *Aeschynomene virginica*. Biological Control 47: 298–308.

Doyle VP, Oudemans PV, Rehner SA, Litt A. 2013. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscapes in North America. PLOS ONE 8: e62394.

Espinal, C. F., Martínez, H. J. y González, E. D. 2005. Cadena del Caucho en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Documento de trabajo N° 4.

Farr DF, Aime, MC, Rossman AY, Palm ME. 2006. Species of *Colletotrichum* on Agavaceae. Mycological Research 110: 1395–1408.

Fedecaucho. 2006. Modulo técnico en Caucho Natural. Fondo nacional de fomento Cauchero. Bogotá, Colombia.

Fernando TH, Jayasinghe CK, Wijesundera RL. 2000. Factors affecting spore production, germination and viability of *Colletotrichum acutatum* isolates from *Hevea brasiliensis*. Mycological Research 104:681-685.

Furtado EL, Silveira AP. 1992. Doenças da seringueira em viveiros e jardins clonais e seu controle. In: Medrado. M. J. S. et al. Formação de mudas e plantio de seringueira. Piracicaba: ESALQ. pp. 52-64.

Furtado E. 1996. Comportamento de cultivares de seringueira (*Hevea* spp.) frente ao Mal das folhas na região do Vale do Ribeira – SP, Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Furtado, E. L. Trinidad D. R. 2005. Doenças da Seringueira, In: Kimati H; Amorim L; Rezende J. A. M; Bergamim Filho A; Camargo, L.E.A, (Org.), Manual de Fitopatologia, 4ed, São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, v. 2. p. 559-567.

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

Gañan L., Alvarez E., y Castaño J. 2015. Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 39(152): 339-347.

Garrido C, Carbú M, Fernández-Acero FJ, Vallejo I, Cantoral JM (2009). Phylogenetic relationships and genome organisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. European Journal of Plant Pathology 125: 397–411.

Gasparotto L., Figueredo dos Santos A., Pereira J. e Ferreira F. 1997. Doenças da seringueira no Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília, Brasil.

Gasparotto, L., Ferreira, F. A., dos Santo, A. F., Rezende, P. J. C., Furtado, E. L. 2012. Capítulo 3: Doenças das folhas. pp. 39-176. En: Gasparotto, L.; Pereira, R. J. C. (Eds.). Doenças da seringueira no Brasil. EMBRAPA Amazônia Occidental. Brasília, DF. 255 p.

Gazis R, Rehner S, Chaverri P (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. Molecular Ecology 20: 3001–3013.

Glass, N.L. & Donaldson, G. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology 61: 1323-1330.

Gomes, R.R., Glienke, C., Videira, S.I.R., Lombard, L., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2013. Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia 31, 1-41.

Gonçalves P., Bataglia O., Ortolani A. y Fonseca F. 2001. Manual de Heveicultura para o Estado de São Paulo, Instituto Agrônômico (IAC), Campinas, 78p.

Guerber, J. C., Liu, B., Correll, J. C. & Johnston, P. R. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. Mycologia 95:872–895.

Guyot J., Omanda. E., Ndoutoume A., Otsaghe A., Enjalric F. y Assoumou H. 2001. Effect of controlling *Colletotrichum* leaf fall of rubber tree on epidemic development and rubber production, Crop Protection 20:581-590.

Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Doering, M., Sessitsch, A., 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 293e320.

Jayasinghe CK, Fernando THPS. 1998. Growth at different temperatures and on fungicide amended media: Two characteristics to distinguish *Colletotrichum* species pathogenic to rubber. *Mycopathologia* 143:93-95.

Jayasinghe CK, Fernando THPS, Priyanka UMS. 1997. *Colletotrichum acutatum* is the main cause of *Colletotrichum* leaf disease of rubber in Sri Lanka. *Mycopathologia* 137:53-56.

Jiang, J., Zhai, H., Li, H., Wang, Z., Chen, Y., Hong, N., Wang, G., Chofong, G. N., Xu, W. 2014. Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Crop Protection*. 58: 41-48.

Johnston PR, Jones D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89: 420–430.

Kelsey, C.R., Crandall, K.A. y Voevodin, A.F. Different models, different trees: the geographic origin of PTLV-I. *Mol. Phys. Evol.*, 13(2):336–347, 1999.

Kleemann, J., Rincon-Rivera, L.J., Takahara, H., Neumann, U., van Themaat, E.V.L., van der Does, H.C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E., O'Connell, R.J., 2012. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog.* 8, 1e15.

Kuo, K. 1999. Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Proc. Natl. Sci. Council.* Vol. 23, No. 3, p. 126-132.

Lima, J.S., Figueiredo, J.G., Gomes, R.G., Stringari, D., Goulin, E.H., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L.V., Glienke, C. 2012. Genetic diversity of *Colletotrichum* spp. an endophytic fungi in a medicinal plant. Brazilian pepper tree. *ISRN Microbiol.* 1e7.

Lee DH, Kim DH, Jeon YA, Uhm JY, Hong SB. 2007. Molecular and cultural characterization of *Colletotrichum* spp. causing bitter rot of apples in Korea. *Plant Pathology Journal* 23: 37–44.

- Mahuku, G. S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and Bacterial DNA. *Plant Mol. Biol. Rep* 22:71-81.
- Meireles Barguil B, Alves de Oliveira SM, Barbosa Coelho RS, Beserra Júnior JEA. 2009. Identificación y variabilidad genética de *Colletotrichum* causando antracnosis en inflorescencias de plantas tropicales ornamentales. *Ciencia Rural* 39:1639-1646
- Mejía Cáceres, S. A. 2010. Potencialidades para la implementación de cultivos de Caucho *Hevea Brasiliensis* en el municipio de Yopal Casanare. Recuperado el 30 de junio de 2012, de [www.bdigital.unal.edu.co/2718/1/sandroalbertomejiacaceres.2010.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/2718/1/sandroalbertomejiacaceres.2010.pdf).
- Menezes M. 2002. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Fitopatologia Brasileira* 27:23-24.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. & Brown, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol Lett* 98:137–144.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (3 de octubre de 2009). Boletín Agenda de investigación de cadenas productivas. Recuperado el 30 de abril de 2012, de [http://www.minagricultura.gov.co/archivos/boletin\\_-\\_agenda\\_003.pdf](http://www.minagricultura.gov.co/archivos/boletin_-_agenda_003.pdf).
- Moriwaki J, Sato T, Tsukiboshi T (2003). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience* 44: 47–53.
- Münch S., Lingner U., Floss D., Ludwig N., Sauer N. and Deising H. 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, Vol. 165, p. 41-51.
- Nirenberg HI. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion Liseola. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 169: 1-117
- Nirenberg HI, Feiler U, Hagedorn G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *Mycologia* 94: 307–320.
- O'Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M.F., et al., 2012. Life style transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* 44, 1060e1065.
- Peres, N.A.R., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E. and Correll, J.C., 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*. Vol. 89 No. 8.p. 784-796.

Peres N.A., MacKenzie S.J., Peever T.L., Timmer L.W. 2008. Postbloom fruit drop of citrus and Key lime anthracnose are caused by distinct populations of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 98: 345–352.

Perfect S., Hughes H., Connell R. and Green J. 1999. *Colletotrichum*: A model Genus for Studies on Pathology and Fungal-Plant Interactions (Review). *Fungal Genetics and Biology* 27, p. 186-198.

Polashock JJ, Oudemans PV, Caruso FL, Mcmanus P, Crouch J. 2009. Population structure of the North American cranberry fruit rot complex. *Plant Pathology* 58: 1116–1127.

Phoulivong, S., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D. 2012. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*. 2 (2): 99-111. <http://dx.doi.org/10.5943/cream/2/2/2>.

Pileggi, S. A., Vieira de Oliveira, S. F., Andrade, C. W., Vicente, V. A., Dalzoto, P. do R., da Cruz, G., Gabardo, J., Massola, N., Tozze, H. J., Pileggi, M., Kava-Corderiro, V. Galli-Terasawa, L. V., Pimentel, I. C., Stringari, D. & Glienke, C. 2009. Molecular and morphological markers for rapid distinction between two *Colletotrichum* species. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 1076–88.

Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 413.

Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., Fluhr, R. 2013. Quiescent and necrotrophic life style choice during postharvest disease development. *Annu. Rev. Phytopathol* 51, 155-176.

Ranathunge, N.P., Mongkolporn, O., Ford, R., Taylor, P.W.J., 2012. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defence mechanisms. *Aust. Plant Pathol.* 41, 463e473.

Rojas E.I., Rehner S.A., Samuels G.J., Van Bael S.A., Herre E.A., et al. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102: 1318–1338.

Saha T., Kumar A., Ravindran M., Jacobs K., Roy B., Nazeer M.A. 2002. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. *Mycological Research* 106: 215–221.

Sambugaro, 2007. Estágios foliares, fenologia da seringueira (*Hevea* spp.) e interação com *Microcyclus ulei* (Mal das folhas), Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.

Salcedo S. 2013. Identificação de espécies de *colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Schoch C, Seifert K, Crous P. 2011. Progress on DNA barcoding of Fungi. IMA Fungus 2: (5).

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 109: 6241–6246.

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.

Sharma, G. & Shenoy, B. D. 2013. *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 47 (10): 1179-1194.

Shaw, M.W., Emmanuel, C.J., Emilda, D., Terhem, R.B., Shafia, A., Tsamaidi, D., Emblow, M., Van, K., Jan, A.L., 2016. Analysis of cryptic systemic Botrytis infections in symptomless hosts. Front. Plant Sci. 7, 1-14.

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.

Sherriff C, Whelan MJ, Arnold GM, Lafay JF, Brygoo Y, Bailey JA. 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. Experimental Mycology 18: 121–138.

Sierra, J, F, 2010, Caracterização e Controle de *Colletotrichum* spp, em seringueira (*Hevea brasiliensis*), Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.

Silva C. 2011. Censo Cauchero, Confederación Cauchera Colombiana.

Silveira A.P., Furtado E.L., Lopes MEBM.1992. Antracnose: nova doença do painel de sangria da seringueira. Summa Phytopathologica 18:195-200.

Simmonds J.H. 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science 22: 437–459.

Smith B. and Black L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Dis (74): 69-76.

Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A. E. & Mills P. R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathol. 45:650-655.

Stone, J.K., 2001. Necrotroph. In: Maloy, O.C., Murray, T.D. (Eds.). Encyclopedia of Plant Pathology, vol. 2. Wiley, New York, pp. 676-677.

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.

Talhinhas P, Mota-Capitão C, Martins S, Ramos AP, Neves-Martins J, Guerra-Guimarães L, Várzea V, Silva MC, Sreenivasaprasad S, Oliveira H. 2011. Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. Plant Pathology 60: 483–495.

Tapiero, A. 2013. Base de datos preliminar para el desarrollo de un programa de manejo de enfermedades en caucho y formulación optimizada de un prototipo de bioplaguicida para el control del gusano cachón *Erinnyis ello*. Informe técnico final. Corpoica C.I. La Libertad.

Verma, N. 2005. Epidemiology of *Colletotrichum acutatum*, cause of anthracnose on Highbush Blueberry, In British Columbia. University of British Columbia, Master of Science, Canada. p. 11-18.

Vinchira D., Mendez M., Garcia I., Suarez Z. and Moreno N. 2017. Evaluation of biocontrol properties of *Streptomyces* spp. isolates against phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *Microcyclus ulei*. African Journal of Microbiology Research. Vol. 11(5), pp. 141-154

Wastie, R,L., Janardhanan, P,S,. 1970. Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. dematium* and *C. crassipes* to leaves of *Hevea brasiliensis*, Trans, Br, Mycol, Soc, 54,

150–152.

Weir B.S., Johnston P.R., and Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115–180.

Wharton P. and Uribeondo J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. Vol 61 (1), p. 3-22.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, and J. J. Sninsky, eds. Academic Press, San Diego, CA. p. 315-322.

Wikee S, Cai L, Pairin N, McKenzie EHC, Su YY, et al. 2011. *Colletotrichum* species from Jasmine (*Jasminum sambac*). *Fungal Diversity* 46: 171–182.

Yuan Z.L., Chen Y.C., Yang Y. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 295– 303.