

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE
Colletotrichum gloeosporioides AISLADOS DE ÑAME (*Dioscorea* spp) EN TRES
ZONAS AGROECOLÓGICAS DEL CARIBE COLOMBIANO**

MARIA JOSE BAQUERO GARRIDO

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
SINCELEJO – SUCRE**

2017

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE
Colletotrichum gloeosporioides AISLADOS DE ÑAME (*Dioscorea* spp) EN TRES
ZONAS AGROECOLÓGICAS DEL CARIBE COLOMBIANO**

MARIA JOSE BAQUERO GARRIDO

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE

MAGISTER EN BIOLOGÍA

DIRECTOR

JAVIER DARIO BELTRAN HERRERA

PhD. en Fitopatología

UNIVERSIDAD DE SUCRE

FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS

SINCELEJO – SUCRE

2017

Notas de aceptación

Firma del presidente del jurado.

Firma del jurado 2.

Firma del jurado 3.

Ciudad y fecha: _____

DEDICATORIA

Todo el honor y toda honra A MI PADRE CELESTIAL.

*A mis padres Alejandro Baquero y María Sandiego Garrido,
Que Descansan En La Paz Del Señor,
por su amor y sacrificio en mi formación integral.*

*A mi esposo Harold Rico Herrera, regalo precioso de mi Dios,
por su amor y compañía*

*A mi hijo, Samuel Elías Rico Baquero,
a mi petoto bebe, por su amor, su apoyo, paciencia y sabiduría.*

AGRADECIMIENTOS

A mi padre eterno por su constante e infinita misericordia, el cual puso en mi camino ángeles para poder caminar por sendas que no veía.

Gracias infinitas a la Universidad de Sucre, alma mater por su formación y apoyo financiero.

A mi director de trabajo de grado Javier Beltrán Herrera, por sus orientaciones.

A mis compañeros del Grupo de Biotecnología Vegetal, colegas y amigos por estar prestos a ayudarme cuando más lo necesité.

A el Biólogo Juan Carlos Guevara por sus aportes invaluable y dedicación. Que el Señor que todo lo provee le retribuya.

Al Biólogo-Magister Jaime Mercado por su ayuda constate en el desarrollo de este trabajo.

Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en este trabajo.

Artículo 12 resolución 02-03.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. MARCO TEÓRICO.....	20
3.1. Generalidades Del Cultivo.....	20
3.2. Origen, biología y botánica del ñame.....	24
3.3. Descripción de la planta.....	25
3.4. Importancia del ñame.....	27
3.5. Limitantes de la producción del cultivo del ñame:.....	27
3.6. Generalidades De La Antracnosis.....	28
3.6.1. Ciclo de la enfermedad.....	29
3.6.2. Etiología.....	32
3.7. Sistemática De <i>Colletotrichum</i>	33
3.7.1. Métodos tradicionales.....	34
3.7.1. 2. Grupos de Compatibilidad vegetativa.....	35
3.7.2. Métodos Moleculares.....	36
3.7.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa iniciada al azar (Ap-PCR).....	36
3.7.2.2. Polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD).....	37
3.7.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores de microsatélites (MP / AMPPCR).....	37
3.8. Técnicas moleculares para el establecimiento de la diversidad y estructura genética.....	38
4. METODOLOGÍA.....	40
4.1. Tipo de estudio.....	40
4.2. Generalidades De La Investigación.....	40

4.3. Fase De Campo.....	41
4.4. Fase De Laboratorio.....	42
4.4.1. Identificación y Caracterización Morfológica.....	42
4.4.2. Mantenimiento de los Aislamientos.....	42
4.4.3. Extracción de ADN Total.....	43
4.4.4. Cuantificación de ADN genómico total.....	43
4.4.5. Electroforesis de ADN extraído en gel de agarosa.....	44
4.4.6. Amplificación mediante PCR.....	44
4.4.7. Caracterización microsatellite-primed PCR (MP- PCR).....	46
4.4.8. Visualización de los productos de amplificación de loci microsatellite-primed PCR (MP-PCR).....	48
4.5. Procesamiento estadístico.....	48
4.5.1. Análisis de datos Morfológicos y Moleculares.....	49
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
5.1. Identificación del agente causal de la antracnosis en ñame.....	51
5.1.1. Análisis de correspondencia múltiple de los caracteres morfométricos.....	56
5.2. Caracterización molecular por PCR de la especie.....	57
5.2.1. Extracción y determinación de la pureza del ADN.....	57
5.2.3. Polimorfismo de adn amplificados por MP-PCR.....	60
5.3. Diversidad genética.....	62
5.3.1. Flujo de Genes.....	62
5.3.2. Distancia Genética.....	64
5.3.3. Composición Genética.....	67
5.3.3.1 Determinación de Delta de k (ΔK) y asignación de poblaciones genéticas.....	67
5.3.3.2 Análisis de correspondencia múltiple.....	69
5.3.4. Aislamiento por distancia.....	70
5.4. Estructura Genética Entre Las Poblaciones.....	74
6. CONCLUSIONES.....	78
7. RECOMENDACIONES.....	80
8. BIBLIOGRAFÍAS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Los 20 países con mayor producción a nivel mundial al 2013 (FAOSTAT, 2014)...	21
Figura 2: Área cosechada, producción y rendimiento del cultivo del ñame en Colombia durante el período 2007-2014 (Minagricultura, 2015)	22
Figura 3: Rendimiento de área cosechada, producción y rendimiento del cultivo del ñame en Colombia durante el período 2007-2014 (Minagricultura, 2015).....	22
Figura 4: Ciclo de la antracnosis causada por <i>C. gloeosporioides</i> (Agrios, 2012).....	30
Figura 5: Estrategias de colonización del genero <i>Colletotrichum</i>	31
Figura 6: Localización de los sitios de estudio. Fuente (Autor).....	41
Figura 7: Registro macroscópico y microscópico de algunos aislados del genero <i>Colletotrichum</i> spp usados en el estudio.....	52
Figura 8: Variación de los caracteres morfológicos observados en los 20 aislados de <i>C. gloeosporioides</i> expresadas en porcentajes.....	54
Figura 9: Comparación de 3 caracteres morfométricos de aislados de <i>C. gloeosporioides</i> mediante test de Tukey ($\alpha=0,05$) en cuatro sitios de muestreos del Caribe Colombiano.....	55
Figura 10: ACM de individuos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> con base en tres características morfológicas, para los cuatro sitios de muestreos.....	57
Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del PCR específico para aislados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	59
Figura 12: Corredor interno de Córdoba-Sucre-Bolívar adaptado según Tafur et al. 2006)....	66
Figura 13: Estimación del número de poblaciones genéticas con base a cuatro loci MP-PCR en 3 zonas del Caribe Colombiano (Earl & Vonholdt, 2012).....	68
Figura 14: Análisis de inferencia Bayesiana con base con base en 4 loci MP-PCR de tres zonas del caribe colombiano.....	69

Figura 15: Análisis de Correspondencia múltiple para 20 individuos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> basado en 4 cebadores tipo MP-PCR, en 3 poblaciones de la Costa Caribe Colombiana.F.....	72
Figura 16: Correlación entre distancias genéticas de Nei y distancias geográficas mediante la prueba de Mantel.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Parámetros reportados para el cultivo de ñame en Colombia 2014 (Minagricultura, 2015).....	23
Tabla 2 Concentraciones de los reactivos empleados en la PCR.....	45
Tabla 3 Ciclos de amplificación de la PCR (Temperatura y Tiempos).....	45
Tabla 4 Códigos y secuencias de los cebadores utilizados en el MP-PCR.....	46
Tabla 5 Ciclos de amplificación de MP – PCR (Temperatura y Tiempo).....	47
Tabla 6 Concentraciones de reactivos empleados en el MP– PCR.....	47
Tabla 7 Procedencia de los aislamiento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtenidos de tres zonas agroecológicas del caribe Colombiano.....	51
Tabla 8 Comparación de 3 caracteres morfométricos de aislados de <i>C. gloeosporioides</i> mediante test de Tukey ($\alpha=0,05$) en cuatro sitios de muestreos del Caribe Colombiano.....	56
Tabla 9 Numero de migrantes entre las poblaciones.....	63
Tabla 10 Variabilidad genética inter-poblacional de distancias genéticas por el coeficiente de Nei.....	64
Tabla 11 Test de Mantel / Prueba bilateral: Distancias genéticas vs Distancias geográficas..	72
Tabla 12 Análisis molecular de varianza jerárquico de 4 loci MP-PCR en 3 zonas agroecológicas de la Costa Caribe Colombiana. Valores de P basado en 9999 permutaciones. P-value. *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$	75
Tabla 13 Parámetros de diversidad genética poblacional para cuatro loci MP-PCR en tres localidades de Costa Caribe Colombia. Na: No de alelos diferentes. Ne: No efectivo de alelos. Ho: heterocigocidad observada. He: heterocigocidad esperada.....	76

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Distancia geográficas entre los sitios de muestreos en kilómetros.....	91
Anexo B: Distancia genética entre los sitios de muestreos por el coeficiente de Nei Li (1972).	91
Anexo C: Variables morfológicas empleadas para la caracterización de <i>C. gloeosporioides</i> .	92

RESUMEN

El ñame pertenece a la familia *Dioscoreacea* género *Dioscorea*. Es una planta de importancia económica en regiones pluviosas tropicales y subtropicales cuyos tubérculos son considerados como producto esencial para la alimentación de millones de personas en África, Asia y América latina. En Colombia se cultiva mayormente en la región Caribe siendo Sucre, Córdoba y Bolívar los mayores productores, jugando un papel fundamental en la seguridad alimentaria regional. No obstante, el ñame se ve afectado por diferentes problemas entre los cuales se encuentra su susceptibilidad a hongos del género *Colletotrichum*, siendo *C. gloeosporioides* la especie de mayor importancia, causante de la enfermedad conocida como antracnosis.

La presente investigación tuvo como objetivo la caracterización molecular y el análisis de la diversidad genética de poblaciones del hongo *C. gloeosporioides* a partir de tres zonas agroecológicas del caribe colombiano, los aislados pertenecientes a la colección de hongos de la Universidad de Sucre fueron hidratados y subcultivados en medio sólido PDA, sometidos a una detallada revisión de sus características morfológicas macro y microscópicas; esta evaluación se realizó por microscopia de luz, utilizando examen directo con lactofenol o azul de algodón, la determinación morfológica se hizo con ayuda de claves taxonómicas. Posteriormente, se identificaron los aislados de la especie *C. gloeosporioides* molecularmente mediante PCR específico con los cebadores ITS 4 y CgInt, las cepas confirmadas molecularmente como *C. gloeosporioides* se caracterizarán genéticamente mediante marcadores tipo MP-PCR, los cálculos fueron realizados con el uso del software GENALEX, utilizando para ello el análisis de varianza molecular (AMOVA), lo que permitió el análisis de la estructura y diversidad y genética.

Los resultados encontrados mostraron que *Colletotrichum gloeosporioides* presenta una alta diversidad genética dentro de las poblaciones estudiadas, indicando mayor variación genética en las poblaciones de Mateo Pérez (0,66) y la Siria (0,49) en comparación con Chinú y San Jacinto con un valor menor a 0,135, y baja estructura genética, debido posiblemente al alto flujo genético en las poblaciones estudiadas, el alto flujo genético entre las poblaciones estudiadas no está relacionado con la distancia geográfica, pero sí con el número de migrantes, es decir que entre mayor es la distancia genética menor es el número de migrantes en una población. En consecuencia todas las poblaciones tienen suficiente flujo genético para no divergir entre ellas por deriva génica, permitiendo la acción efectiva de la selección natural.

Palabras Claves: ñame, antracnosis, *Colletotrichum*, MP-PCR.

ABSTRACT

The yam belongs to the family Dioscoreaceae genus *Dioscorea*. It is a plant of economic importance in tropical and subtropical rainy regions whose tubers are considered an essential product for the feeding of millions of people in Africa, Asia and Latin America. In Colombia it is grown mostly in the Caribbean region, with Sucre, Córdoba and Bolívar being the main producers, playing a fundamental role in regional food security. However, the yam is affected by different problems among which is its susceptibility to fungi of the genus *Colletotrichum*, being *C. gloeosporioides* the most important species, causing the disease known as anthracnose.

The objective of the present investigation was the molecular characterization and the analysis of the genetic diversity of the *C. gloeosporioides* fungus populations from three agro-ecological zones of the Colombian Caribbean, the isolates belonging to the mushroom collection of the University of Sucre were hydrated and subcultured in solid PDA medium, subjected to a detailed review of their macro and microscopic morphological characteristics; this evaluation was performed by light microscopy, using direct examination with lactophenol or cotton blue, the morphological determination was made with the help of taxonomic keys. Subsequently, isolates of the species *C. gloeosporioides* were identified molecularly by means of specific PCR with the primers ITS 4 and CgInt, the molecularly confirmed strains as *C. gloeosporioides* will be characterized genetically by markers type MP-PCR, the calculations were made with the use of the GENALEX software, using molecular variance analysis (AMOVA), which allowed the analysis of structure and diversity and genetics.

The results showed that *Colletotrichum gloeosporioides* presents a high genetic diversity within the studied populations, indicating greater genetic variation in the populations of Mateo Pérez (0,66) and Siria (0,49) compared to Chinú and San Jacinto with a value less than 0.135, and low genetic structure, possibly due to the high genetic flow in the populations studied, the high genetic flow between the populations studied is not related to geographical distance, but to the number of migrants, that is, the higher the is the smallest genetic distance is the number of migrants in a population. Consequently, all populations have sufficient gene flow so as not to diverge between them by gene drift, allowing the effective action of natural selection.

Key Words: yam, anthracnose, *Colletotrichum*, MP-PCR.

1. INTRODUCCIÓN

El ñame está distribuido en regiones tropicales y subtropicales de alta pluviosidad. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción a nivel mundial en el periodo comprendido entre 1992 y 2012, ha sido liderada en un 96,04% por países africanos por su parte el continente americano aporta el 2,72% de la producción mundial, siendo Colombia su mayor representante (FAOSTAT, 2014). El cultivo de ñame en Colombia es importante en la Costa Caribe, región que concentra el 90% de la producción nacional, principalmente en 26 municipios pertenecientes a los departamentos de Bolívar, Córdoba y Sucre, donde se ubican las zonas agroecológicas de interés del presente proyecto, los cuales aportan el 92 % del área cultivada del país (Ministerio de Agricultura, 2015). Allí existen núcleos productivos integrados por pequeños productores que explotan el cultivo en terrenos con áreas menores a 2 ha (Bustamante, Guzmán, & Buitrago, 2003; Minagricultura, 2009), también es un producto de exportación a mercados internacionales básicamente para consumo fresco a Estados Unidos, Puerto Rico y las islas del Caribe, Colombia para el año 2008 exportó 4.800 toneladas de ñame y en lo corrido de 2009 los envíos superaron las 3.000 toneladas, por valor de 2 millones de dólares. (Bustamante et al., 2003)

Alrededor de más de 18.500 familias agricultoras con muy pocos recursos económicos cultivan ñame basando buena parte de sus ingresos en los rendimientos de este cultivo. Dentro de los factores de gran impacto socioeconómicos tenemos la falta de tenencia de tierra, lo que lleva al productor a cultivar áreas que oscilan entre 0.25 a 2 hectáreas, sin embargo esto no es suficiente para superar los requerimientos y necesidades básicas que los afectan (Osorio & Ramírez, 1989). No obstante su importancia como cultivo, este afronta algunos problemas de tipo tecnológico entre los cuales se encuentran un número limitado de genotipos cultivados, básicamente dos especies conocidas como son *D. alata* y *D. Rotundata* dominan en gran porcentaje el área cultivada, lo que representa una base

genética muy estrecha para este cultivo, creando mayor vulnerabilidad a factores medioambientales y biológicos adversos. Adicionalmente no se dispone de un programa de fitomejoramiento que provea de nuevas variedades y /o clones tolerantes a la enfermedad más devastadora del cultivo del ñame, la antracnosis (*Colletotrichum spp*). Además, en los mercados tanto nacionales como internacionales los genotipos tolerantes disponibles no son de interés para consumo fresco.

En cuanto a los aspectos fitosanitarios del cultivo del ñame encontramos la enfermedad de la antracnosis causada por hongos del género *Colletotrichum* este hongo pertenece a uno de los géneros patógenos de plantas más importantes ya que ataca especialmente cultivos de regiones tropicales y subtropicales (Aranza, 2012; Cerón Rincón, Higuera, Sánchez, Bustamante, & Buitrago, 2006). La sintomatología comúnmente conocida incluye lesiones necróticas, circulares o radiales, reconociéndose esta enfermedad como una de las amenazas más devastadoras del cultivo a nivel global (Abang, 2003; Cerón Rincón et al., 2006).

Los diagnósticos de esta enfermedad en el campo muestran un alto índice de daños agro-económicos, existiendo datos estadísticos que muestran pérdidas hasta del 100% dependiendo de las condiciones de susceptibilidad de los clones de ñame utilizados, lo cual conlleva a un incremento en los costos de producción para su control por parte de los productores (González Vega, 2012).

Para efectos de contribuir al control de la enfermedad y disminuir el alto impacto económico que tiene en las pequeñas economías campesinas es prioritario y pertinente el conocimiento e identificación completa del agente patógeno (Aranza, 2012). En la actualidad se tienen procesos previos de caracterización morfológica del género, que no son suficientemente discriminante y aclaratoria al momento de determinar la identidad taxonómica, sumados al desconocimiento de la estructura y diversidad genética de las especies. En tal sentido los marcadores moleculares son herramientas que han probado ser de uso invaluable para la resolución de problemas donde se dificulta la identificación de agentes biológicos y su variabilidad genética. De esta manera se pretende la aplicación de metodologías de mayor resolución para determinar la diversidad genética de este agente patógeno de naturaleza

fúngica que afectan el cultivo del ñame en la región caribe colombiana. La información generada a partir de las fuentes de caracterización morfológica y molecular permitirá reconocer si especies, patotipos, aislamientos o variedades distintas de este género afectan las *Dioscorea spp* y/o la posible existencia de variabilidad genética entre los aislados.

La falta de información disponible acerca de la diversidad molecular de especies de *Colletotrichum* en cultivos de *Dioscorea spp* en las zonas de influencia del cultivo en la región Caribe colombiana, obstaculiza la generación de modelos de la estructura poblacional de los hongos, que pueden ser de utilidad en procura de generar alternativas de solución con las cuales se contribuyan a futuro establecer estrategias y planes de control en el cultivo del ñame, conllevando a mejorar su comportamiento frente a factores bióticos y abióticos adversos y a la vez aumentar su potencial en la productividad del cultivo, mejorar la condición social y económica del productor y proteger el medio ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la estructura genética y la diversidad entre poblaciones de *C. gloeosporioides* aislados de ñame (*Dioscorea* spp) de tres zonas agroecológicas del caribe colombiano.

2.2. Objetivos Específicos.

- Caracterizar aislados de *C.gloeosporioides* de ñame (*Dioscorea* spp) de tres zonas agroecológicas del Caribe Colombiano.
- Analizar la diversidad genética de poblaciones de *C. gloeosporioides* aislados de ñame (*Dioscorea* spp) de tres zonas agroecológicas del Caribe Colombiano.
- Determinar la estructura genética de poblaciones de *C. gloeosporioides* aislados de ñame (*Dioscorea* spp) de tres zonas agroecológicas del Caribe Colombiano.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades Del Cultivo.

El ñame es un tubérculo distribuido en regiones tropicales y subtropicales de alta pluviosidad, es considerado uno de los tubérculos de mayor importancia agroeconómica a nivel mundial después de la papa, la yuca y la batata, constituyendo la principal fuente de ingresos y empleo en muchas zonas rurales del mundo (FAOSTAT, 2006; González, 2012; S.L, 2013). “El ñame es una planta dioica del género *Dioscórrea* que pertenecen a la familia *Dioscoreáce*a. La familia *Dioscoreáce*a comprende seis géneros, de los cuales *Dioscórrea* es el mayor. Cerca de 600 especies han sido identificadas. Dentro de éste género Montaldo, (1991), las especies comestibles de valor comercial son: *D. rotundata* (ñame espinoso o portugués), *D. alata* (ñame oso, diamante, blanco o criollo), *D. trifida* (Yampí o ñame cush-cush) y *D. cayenensis* (ñame amarillo o de Guinea) (Pérez et al., 2005; Rodríguez, 2000; Sánchez & Hernández, 1998; Tafur, Toro, Perfetti, Ruiz, & Morales, 2006). “Este tubérculo tropical, es muy popular en Centro y Sur América, al igual que en el Caribe, África y partes del Asia. Diversas variedades de ñame se cultivan a través de los trópicos y en la parte de las regiones subtropicales”(Montaldo, 1991).

El ñame en América tropical es cultivado desde la época precolombina por pueblos indígenas, y pequeños y medianos agricultores (González, 2012). Para el periodo comprendido entre 1992 y 2012 el aporte promedio de los países americanos a la producción mundial apenas alcanzó un 2,72% (FAOSTAT, 2006). Según datos de la FAO Colombia con 361.034 t, Cuba con 349.692 t, Haití con 322.709 t, Brasil con 244.142 t y Venezuela con 102.140 t; fueron los países americanos que para el año 2012 hicieron parte de la lista de los veinte países con mayor producción a nivel mundial (Figura 1).

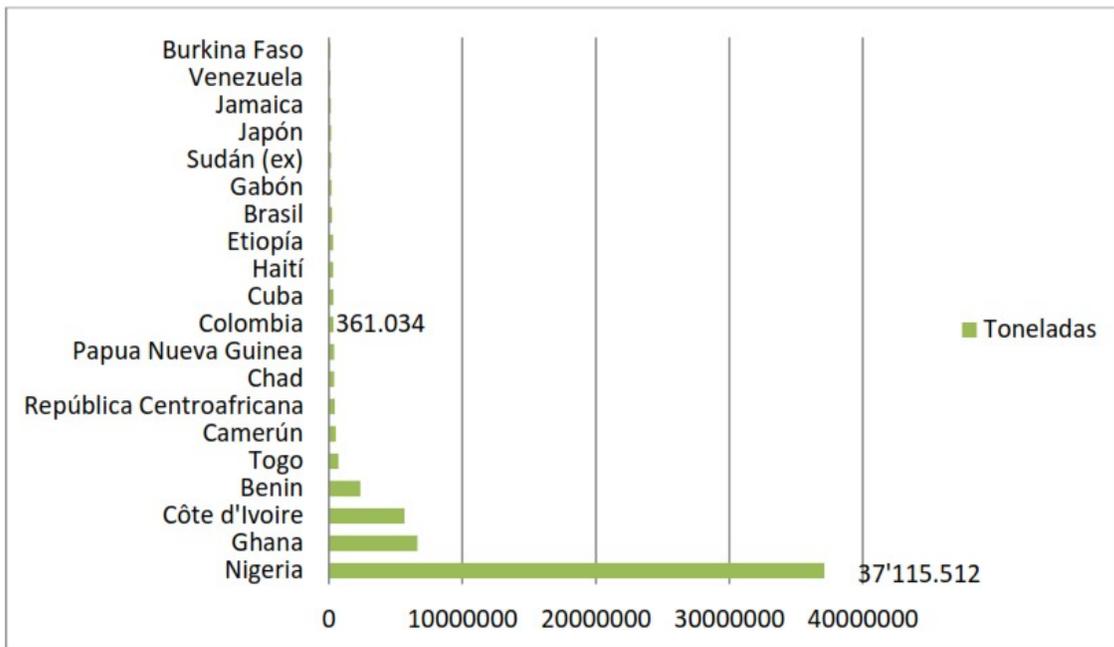


Figura 1: Los 20 países con mayor producción a nivel mundial al 2013 (FAOSTAT, 2014).

Los datos más recientes de la Red de Información y Comunicación Estratégica del Sector Agropecuario–Colombia (Minagricultura, 2015) reportan para Colombia en el 2014 un área cosechada del cultivo de 33.878 ha y un rendimiento de 8,47 t/ha y una producción de 365.395 ton (Figura 2 y 3). En Colombia según reportes del Instituto Colombiano Agropecuario (Minagricultura, 2009), para el 2009 la exportación de ñame a Estados Unidos, Puerto Rico y algunas islas del Caribe se ha fortalecido, perfilándose como uno de los productos con mejores alternativas de exportación después de las flores, el banano, el café y la uchuva.

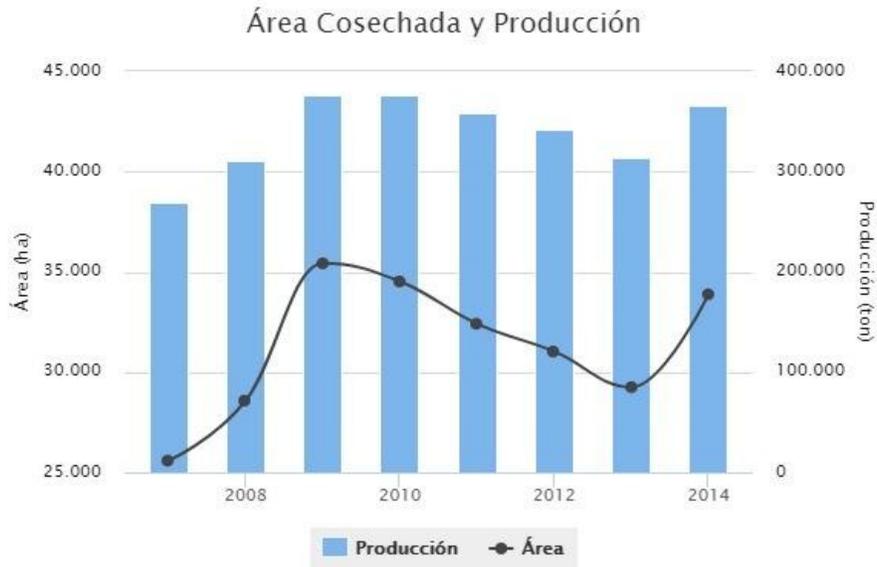


Figura 2: Área cosechada, producción y rendimiento del cultivo del ñame en Colombia durante el período 2007-2014 (Minagricultura, 2015) .

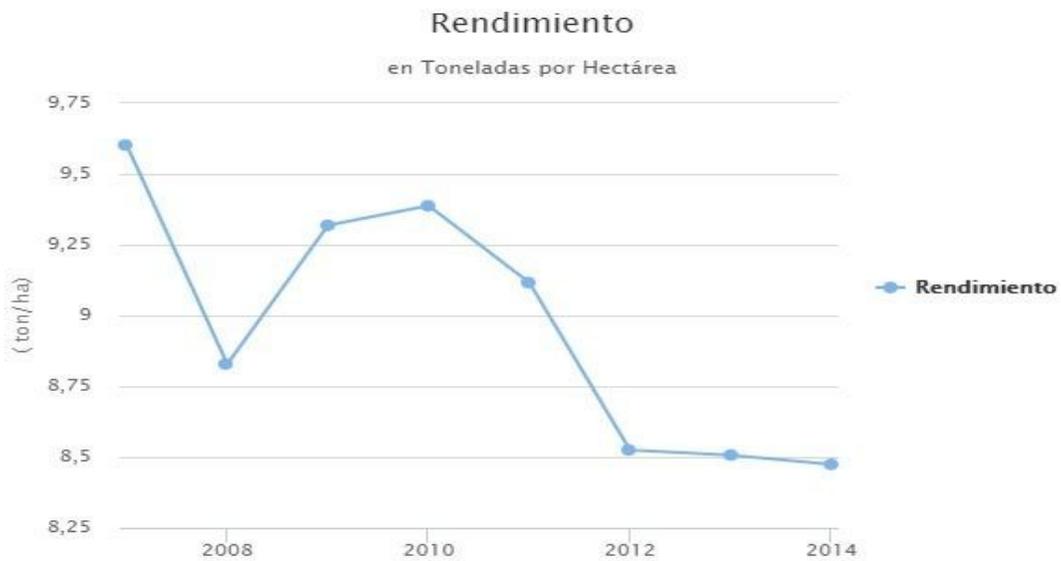


Figura 3: Rendimiento de área cosechada, producción y rendimiento del cultivo del ñame en Colombia durante el período 2007-2014 (Minagricultura, 2015).

En Colombia el ñame es uno de los productos de gran importancia socio-económica y cultural especialmente en la Costa Caribe aporta más del 90% de la producción colombiana de ñame específicamente los departamentos de Córdoba, Bolívar y Sucre (Tabla 1). El área sembrada se concentra en 26 municipios entre los que se destacan Chalan, Coloso, Tolú Viejo, Ovejas, Carmen de Bolívar, Sampues, Morroa, San Antero, Coveñas, Lorica, Moñitos, San Pelayo, Cereté, Sincelejo, San Jacinto, San Juan Nepomuceno, San Antonio y Palmito; en donde existen núcleos productivos integrados por pequeños productores que explotan el cultivo en terrenos con áreas menores a dos hectáreas. En estas zonas, el tubérculo se ha constituido como un producto tradicional en las costumbres tanto productivas como alimenticias de los habitantes, en especial de la población rural (Bustamante, Guzmán, & Buitrago, 2003; Minagricultura, 2009). Otros departamentos como Antioquia, Chocó, Casanare y Vaupés tienen una participación minoritaria en la producción nacional (Aranza, 2012).

Tabla 1 Parámetros reportados para el cultivo de ñame en Colombia 2014 (Minagricultura, 2015).

Departamento	Año	Área Cosechada.(Ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)
Bolivar	2014	13147	158570	12.06130676
Córdoba	2014	13785.5	140079.5	10.1613652
Sucre	2014	2793	26962	9.653419262
Antioquia	2014	1342	17165	12.79061103
Chocó	2014	1089	6555.4	6.019651056
Atlántico	2014	569.5	3665	6.43546971
Cesár	2014	450	6750	15
Magdalena	2014	410	3315	8.085365854
La Guajira	2014	260	2205	8.480769231

Sin embargo la producción de ñame en la Región Caribe Colombiana depende principalmente de *Dioscorea alata* y *Dioscorea Rotundata* , de las cuales la primera es altamente susceptible a hongos de los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium*, la segunda es tolerante a hongos del género *Colletotrichum* (Osorio & Ramírez, 1989). Estos hongos causan al cultivo la enfermedad de la Antracnosis conocida por los productores como “la quemazón del ñame” y la enfermedad de la marchitez descendente respectivamente.

3.2. Origen, biología y botánica del ñame.

“El ñame es una planta monocotiledónea, que pertenece al orden Dioscoreales y a la familia Dioscoreácea. Es un tubérculo originario de tres lugares distintos, *Dioscorea alata* es oriundo del sudeste Asiático, *Dioscorea cayenensis* y *Dioscorea rotundata* son de África y *Dioscorea trifida*, es la única especie comestible originaria de América. De las 600 especies de ñame 60 son comestibles y de estas doce son cultivadas” (Montaldo, 1991).

Como señala Sarmiento-Rondón, Perez, Gonzalez, & Negrón (2010), el ñame a diferencias de otras raíces y tubérculos posee una alta diversidad genética. Su distribución se alcanzó al final del periodo cretáceo y su evolución subsecuente sucedió por separado en el viejo y nuevo mundo, las plantas presentan tallo aéreo anual, puede llevar o no espinas, hojas alternas u opuestas, largamente pecioladas. Las hojas son generalmente simples, con ápice agudo; la nervadura principal es radiada, originada en la base; la nervadura secundaria es reticulada, y el tubérculo es una capsula aplanada o circular que es verde al formarse y café al madurar, los rizomas pueden ser solitarios o en grupos. El rizoma y las raíces principales brotan a partir de una especie de cormo que aparece muy temprano en el ciclo de la planta. Los tubérculos que se forman, son de color blanco en su interior, de peso y tamaño variable. Su forma varía dependiendo del cultivar, pero predominantemente son cilíndricos y ricos en carbohidratos (Montaldo, 1991; Sarmiento-Rondón et al., 2010).

3.3. Descripción de la planta

La clasificación taxonómica del género *Dioscorea* según Janssens 2001 citado por (González , 2012):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Dioscoreales

Familia: Dioscoreaceae

Género: *Dioscorea*

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

Las plantas se forman a partir de los cormos o tallos subterráneos los cuales constituyen el eje donde convergen los bejucos, el tubérculo y las raíces principales (González , 2012). De los bejucos se originan las hojas, raíces y estolones de la planta, estos últimos crecen en

círculos sucesivos y pueden llegar a medir hasta 70 cm de largo, posteriormente se ensanchan formando el tubérculo (Aranza, 2012).

Los tubérculos son de superficie rugosa o lisa a veces con raicillas, la pulpa es uniforme, compacta y puede variar de color entre blanco, amarillo y morado. En cuanto a tamaño y forma también se encuentra gran diversidad, su peso comúnmente es de 300 a 400 g, sin embargo pueden alcanzar hasta 10 kg. Su contextura puede ser esférica, fusiforme, claviforme y con ramificaciones cortas (FAO, 2006; S.L, 2013).

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

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

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

3.4. Importancia del ñame.

Como describe Sarmiento-Rondón et al. (2010) el ñame es un cultivo de pequeños y medianos agricultores, que constituye en muchas regiones de África occidental, parte de Asia suroriental, la India, algunas zonas de Brasil y otros países de América tropical, su principal fuente de ingresos y de empleo rural, es considerado el segundo cultivo en eficiencia para producir energía digestible, después de la papa. “La producción mundial de ñame, se estimó en 49.183.219 Toneladas en los últimos años y más del 90% de ésta (46 millones de toneladas por año) se produce en el occidente de África.” “Siendo las especies más sembradas *D. rotundata* y *D. alata* a nivel mundial.”

“En Colombia *D. alata* y *D. rotundata* son las especies de ñame de mayor importancia por el área sembrada, como por la demanda del tubérculo. En la Costa Caribe (zona de mayor producción de ñame) se cultivan alrededor de 26.502 ha, con un rendimiento promedio de 11,7 Ton ha⁻¹ y una producción anual de 310.205 Ton. De este producto se sostienen unas 20 mil familias de los departamentos de Sucre, Córdoba y Bolívar (Tafur et al., 2006).

3.5. Limitantes de la producción del cultivo del ñame:

El cultivo del ñame es afectado por diferentes factores depresivos de la producción, tanto del orden biótico y abiótico destacándose por su mayor importancia los factores biológicos, en la actualidad la atención está centrada en las enfermedades causadas por virus como los potyvirus y por hongos del género *Colletotrichum*, causante de la antracnosis; y por hongos del género *Fusarium* causantes de la marchitez descendente. Para *Colletotrichum*, se reporta en Colombia en todas las áreas productoras con un alto índice de daños agro-económicos, existiendo datos estadísticos que muestran pérdidas hasta del 100 % dependiendo de las condiciones de susceptibilidad de los clones, lo cual conlleva a un incremento en los costos de producción para su control por parte de los productores (Osorio & Ramírez, 1989). Esta enfermedad también a causado en Nigeria, isla Salmón, Puerto Rico, EEUU, India, África Occidental y Oriental (Hadden & Black, 1989); en el caso de *Fusarium* no se conoce el tipo de impacto a nivel de producción, ni porcentaje de pérdidas reportadas en el cultivo del ñame, y no se tienen reportes actualizados.

3.6. Generalidades de La Antracnosis

Con el termino Antracnosis se acostumbra a designar a las enfermedades cuya característica es presentar en los tallos, hojas y frutos de las plantas afectadas, lesiones típicas necróticas (tejidos muertos), esta enfermedad la causan los hongos pertenecientes a los géneros *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Gnomia*, *Marzzonia*, *Mycospharella*, *Neofabre* y *Pseudopezzia*, que afectan diferentes cultivos (García, 1988). Los primeros signos de la infección son pequeñas manchas café, con bordes amarillentos principalmente en las hojas de las partes bajas de las plantas, también se observan círculos concéntricos de color marrón, claro oscuro y una decoloración de las hojas en la región de las nervaduras, las cuáles al madurar conservan su tono pálido rojizo en el haz, mientras que por el envés son de color muy oscuro y de aspecto brillante (Osorio & Ramírez, 1989). De estas lesiones características se han aislado consistentemente hongos del género *Colletotrichum*, el cual comprende una amplia gama de especies, donde *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. orbiculare*, son las más importantes (Cannon et al., 2008) este género presenta un micelio ramificado, inmerso, septado que tiene una coloración hialina hasta un castaño pálido, el acérvulo es subcuticular, epidermal formando tonos hialinos o a veces castaños con una pared densa o gruesa (Sutton, 1992).

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

prometedoras que garanticen eficiencia y sostenibilidad para la prevención y control de la antracnosis.

Es por esto que en los últimos años se han realizado trabajos encaminados a la colecta y caracterización morfológica de *Colletotrichum gloeosporioides*, trabajos en caracterización de especies y/o subespecies del hongo causante de la enfermedad de la antracnosis en los cultivos del ñame de la Costa Caribe Colombiana, teniendo como resultado la constitución de un cepario del género *Colletotrichum spp*, y la caracterización morfológica y taxonómica de los aislamientos establecidos en la colección. Estas colecciones son la base fundamental para iniciar y desarrollar procesos de identificación y caracterización molecular de éste género. Aproximaciones al entendimiento de la composición de las poblaciones de *C. gloeosporioides* en diferentes hospederos, han sido valiosas en otras, investigaciones como herramienta basadas en la evaluación de características morfológica y moleculares basadas en el estudio del ADN (Abang, 2003). La información generada a partir de las diferentes fuentes de caracterización morfológica y molecular y su correlación permitirá reconocer sí patotipos, aislamientos o variedades distintas de *C. gloeosporioides*, afectan a el cultivo de ñame de la región Caribe Colombiana o si existe variabilidad tanto morfológica como molecular entre los aislados.

3.6.1. Ciclo de la enfermedad

El ciclo de la antracnosis es similar en la gran gama de plantas a las que ataca (Figura 4) los conidios una vez establecidos en la superficie del hospedero forman un tubo germinativo corto que transcurridas de 12 a 24 h inicia su diferenciación a apresorio, esta etapa es desencadenada por la síntesis de proteínas específicas en el patógeno inducidas por señalización de la planta hospedera. Infecciones originadas por ascosporas rara vez se presentan pues suelen ser poco eficientes energéticamente (Agrios, 2012; Cano, Guarro, & Gené, 2004; Hwang, Flaishman, & Kolattukudy, 1995; Münch et al., 2008).

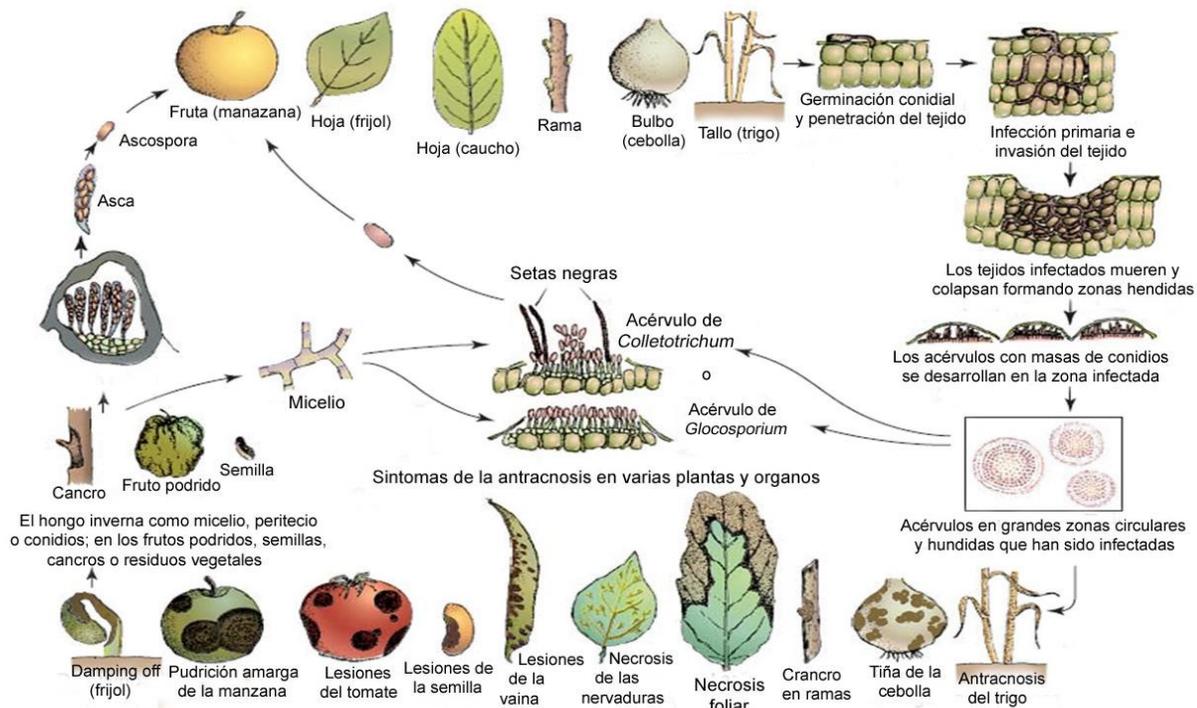


Figura 4: Ciclo de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* (Agrios, 2012).

A continuación se da la maduración del apresorio por inclusión de capas de melanina y síntesis de componentes osmóticos activos (Agrios, 2012; Münch et al., 2008) y se produce un poro de penetración, del cual emerge un punto delgado de crecimiento o pega para penetrar la cutícula del hospedero y como resultado un punto de luz interior puede ser identificado en el apresorio (Wharton & Diéguez, 2004). A partir de este momento el hongo puede adoptar dos tipos de estrategias de infección (Figura 5):

- **Hemibiotrofia intracelular:** Este tipo de colonización comprende dos fases de nutrición, la primera llamada biótrofa que es de corta duración y está presente durante los estadios tempranos de la colonización fúngica, se asocia con hifas primarias intracelulares gruesas o vesículas multilobuladas que colonizan células epidermales y mesófilas adyacentes. Esta etapa se caracteriza por ser asintomática postpenetrativa, en ella el patógeno restringe la expresión enzimática asociada a degradación de la pared vegetal, limitándose a obtener alimento mientras las células del hospedero

penetradas permanecen viables. La segunda conocida como necrótrofa ocurre en las etapas tardías de la infección, se caracteriza por ser destructiva y se asocia con hifas secundarias angostas, la cuales se ramifican a través del tejido hospedante inter e intracelularmente, mientras secretan enzimas para degradar la pared celular vegetal causando la muerte de las células hospederas que posteriormente son usadas como alimento (5-a). Finaliza con la aparición de síntomas de la enfermedad y producción de conidios por parte del patógeno (Cerón Rincón et al., 2006; Diéguez-Uribeondo, Förster, Soto-Estrada, & Adaskaveg, 2005; Münch et al., 2008; Shen, Goodwin, & Hsiang, 2001; Stephenson, Hatfield, Rusu, Maclean, & Manners, 2000; Than et al., 2008; Wharton & Diéguez Uribeondo, 2004).

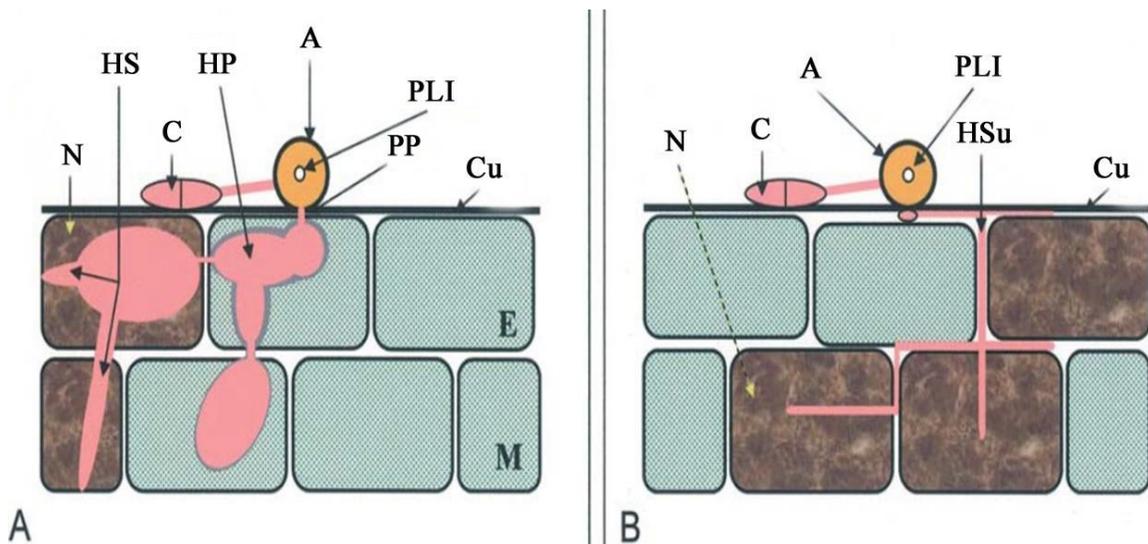


Figura 5: Estrategias de colonización del genero *Colletotrichum*.

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

- **Necrotrofia intramural subcuticular:** En esta etapa una vez el patógeno penetra la cutícula se restringe su entrada inmediata al lumen celular, iniciando en cambio una extensión mediante hifas subcuticulares e intramurales debajo de la cutícula, entre la pared periclinal y anticlinal de las células epidermales.

No es claro si las células del hospedante permanecen vivas, pero los síntomas solo aparecen hasta 24 h después de la penetración. Después del breve período asintomático, el hongo comienza a expandirse rápidamente a través del tejido del hospedante intra e intercelularmente, matando las células vegetales y degradando las paredes celulares (5-b) (Rodríguez & Gaitán, 2007; Wharton & Diéguez Uribeondo, 2004).

En cualquiera de las dos estrategias expuestas, el micelio forma acérvulos debajo de la cutícula dispuestos en forma concentrica o dispersa en las lesiones y al romperse son liberados conidios para una vez más iniciar las infecciones (Figura 5). El hongo también puede albergarse en residuos en descomposición; tallos, hojas y frutos enfermos; canchales de perennes; semillas de plantas anuales; hospederos alternativos (como endófito) y como parásito vegetal a nivel subepidérmico en forma de acérvulos, en donde puede sobrevivir en climas secos (Figura 5). En climas cálidos húmedos los conidios pueden retomar su ciclo de vida y ser diseminados a través de la lluvia, viento e insectos (Williams, Kubelik, Livak, Rafalski, & Tingey, 1990) (Agrios, 2012).

Adicionalmente las malas prácticas de manejo en cuanto al tratamiento de restos de material vegetal, herramientas o semillas contaminados, contribuyen significativamente a la dispersión del patógeno. En el cultivo de ñame esta última fuente de asentamiento del hongo representa la mayor causa de su dispersión, ya que el material de siembra, en este caso los tubérculos, son frecuentemente intercambiados entre zonas productoras (Agrios, 2012; Amusa, Adegbite, & Oladapo, 2005; Ripoché, Jacqua, Bussière, Guyader, & Sierra, 2008).

3.6.2. Etiología

En ñame la antracnosis causada por la especie fúngica *Colletotrichum gloeosporioides* es la enfermedad más limitante del cultivo a nivel mundial. La enfermedad puede afectar hojas, peciolo y tallos de la planta, conllevando a una extensiva necrosis del follaje. Pérdidas de productividad de un 80% e incluso de la totalidad de las cosechas han sido reportadas en el occidente de África, el Caribe, la India y el Pacífico sur (Abang et al., 2002, 2006; Abang, Hoffmann, Winter, Green, & Wolf, 2004; Abang, 2003; Amusa et al., 2005). En Colombia esta enfermedad causó las mayores pérdidas registradas para el cultivo en el país con una dramática reducción del área sembrada que pasó de 25.000 ha en 1989 a 4.547 ha en 1990, la tasa de crecimiento promedio anual durante este periodo de tiempo fue de aproximadamente 0,3% (Aranza, 2012; Cerón et al., 2006), extremadamente baja en comparación con el 4,8% calculado según datos de Minagricultura (2015) para el periodo comprendido entre 1996 y 2010.

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

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

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

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

3.7. Sistemática De *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* antiguamente conocido con el nombre de *Vermicularia*, fue descrito por primera vez por Tode (1790); Hyde et al. (2009); Sutton (1980) posteriormente Corda (1831), lo establece como género *Colletotrichum* y desde entonces se caracteriza por presentar conidios hialinos, rectos o falcados y acérvulos setosos. Más tarde, von Arx (1957), estudió la taxonomía de este género con cuidado y redujo el número de taxones descritos desde varios cientos hasta 11 especies aceptadas, luego Sutton (1992) aumentó el número de especies aceptadas de *Colletotrichum* a 39. Sin embargo, de acuerdo con el autor, la posición taxonómica de algunas especies sigue sin estar claro. Varias especies de *Colletotrichum*, es decir, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. graminicola* y *C. dematium* están ampliamente definidos y se consideran complejos de especies o “especie de grupo” (Cannon, 2000; Sutton, 1992). Muchas especies son ahora considerados como sinónimos de *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. Hay cerca de 600 sinónimos para ser citados para esta especie. *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding y Schrenk H.) se encuentra en un amplio rango de plantas hospederas. Los límites de las especies actualmente definidas son vagas y las relaciones dentro de algunos de estos complejos de especies no están bien resueltos (Cannon, 2000; Sutton, 1992).

Colletotrichum es un género anamórfico con un comportamiento de apareamiento complejo, sólo unas pocas especies son conocidas por producir el teleomorfo *Glomerella*, la taxonomía del género se basa en el anamorfo *Colletotrichum*, a su vez, muestra una alta plasticidad de los rasgos morfológicos que se utilizan tradicionalmente para la identificación de especies y por lo tanto, las descripciones morfológicas de las diferentes especies se superponen considerablemente (Freeman, Katan, & Shabi, 1998; Sutton, 1992). Además, existe una gran variación entre y dentro de las especies de *Colletotrichum* en el aspecto cultural, de patogenicidad y con la relación patógeno- hospedero (Sutton, 1992). Por lo tanto, estas características pueden hacer que la identificación de las especies de *Colletotrichum* sea difícil e imprecisa. La sistemática molecular ha sido utilizada con éxito en los estudios de este

género problemático y ha dado como resultado unas buenas delimitaciones de las especies (Cannon et al., 2008; Freeman et al., 1998; Hyde et al., 2009).

3.7.1. Métodos tradicionales

Métodos tradicionales de identificación de especies pertenecientes al género *Colletotrichum*, así como otros hongos filamentosos, siempre han confiado en características morfológicas, como el color de la colonia, el tamaño y conidios, presencia o ausencia de setae y teleomorfo, y criterios culturales (Agrios, 2012; Gunnell & Gubler, 1992; Liyanage, McMillan, & Kistler, 1992; Sutton, 1980; Sutton, 1992; Van der Aa, Noordeloos, Gruyter, 1990). Smith & Black (1990) han Utilizaron estas características con éxito en la diferenciación entre especies de *C. Fragariae*, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* asociados con las enfermedades de fresa. Las tasas de crecimiento y la morfología conidial se pueden aplicar como parámetro para distinguir *C. acutatum* de *C. gloeosporioides* (Simmonds & others, 1966; Sreenivasaprasad & Talhinhas, 2005; Vinnere, Fatehi, Wright, & Gerhardson, 2002).

Sin embargo, hasta cierto punto, las características morfológicas por sí solas no puede ser utilizadas como una herramienta fiable para la Identificación de especies de *Colletotrichum*, especialmente dentro de complejos de especies que comparten morfología similar pero son genéticamente diferentes (Sutton, 1980; Sutton, 1992). Las especies de *Colletotrichum* cultivadas in vitro producen frecuentemente formas intermedias de conidios que varían considerablemente en la apariencia de la colonia (Cannon, 2000; Freeman et al., 1998; Sutton, 1992). Muchos de los rasgos morfológicos del género *Colletotrichum* son extremadamente variables y dependen principalmente de las condiciones culturales y ambientales, que son raramente estandarizadas (Sutton, 1992).

3.7.1. 2. Grupos de Compatibilidad vegetativa

De la misma manera entre los métodos tradicionales encontramos las pruebas de compatibilidad vegetativa (VCG) la cual es la capacidad que tienen las hifas de dos individuos de fusionarse y formar un heterocariónte que contiene los núcleos de las cepas

parentales. Este mecanismo ofrece otra herramienta para determinar la relación genética entre las poblaciones de hongos patógenos de reproducción asexual (Abang et al., 2004; Abang et al., 2009; Barcelos, Souza, & Damasceno e Silva, 2011). Este enfoque no puede ser utilizado para la clasificación taxonómica de *Colletotrichum*, pero es útil para la caracterización de la diversidad genética de las poblaciones de *Colletotrichum*, lo cual es valioso para conocer la etiología de la enfermedad, la estructura de la población, la especificidad del huésped, distribución geográfica y la estrategia reproductiva.

3.7.2. Métodos Moleculares.

Las herramientas moleculares pueden ser aplicadas con éxito para la discriminación entre las especies y los genotipos de *Colletotrichum*. Los métodos moleculares que se han empleado se puede dividir en dos grupos principales. El primero de ellos consiste en técnicas basadas en PCR, que se utilizan comúnmente para caracterizar la diversidad genética entre las poblaciones de *Colletotrichum* y especies estrechamente relacionadas. Los métodos más comúnmente utilizados en esta categoría incluyen RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) MP-PCR (PCR iniciada con microsatélites), PCR-RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción PCR), AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados); el otro grupo se basa en comparaciones de secuencias de ADN de las regiones genéticamente variables, que han sido ampliamente utilizados para la identificación y caracterización de las especies de *Colletotrichum* (Damm, Woudenberg, Cannon, Crous, 2009; Hyde et al., 2009).

3.7.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa iniciada al azar (Ap-PCR)

Los marcadores (ap-PCR) son rápidos, baratos y adecuados para estudiar grandes cantidades de muestras. Este enfoque sólo requiere cantidades mínimas de ADN, Pueden ser aplicados sin información genética previa sobre el organismo y son tratados como marcadores dominantes (Weising, Nybom, Pfenninger, Wolff, & Kahl, 2005). Los marcadores Ap-PCR son herramientas valiosas para identificar la variación en una amplia variedad de fitopatógenos y pueden diferenciar entre grupos de patógenos estrechamente relacionados (Assigbetse, Fernandez, Dubois, Geiger 1994; Freeman et al., 1998). En general, estos

métodos han sido utilizados con éxito para la discriminación y caracterización de las especies de *Colletotrichum*, lo que incluye la determinación de la variación genética a nivel inter e intra poblacional. (Abang et al., 2006; Freeman et al., 1998; Lu, Cannon, Reid, & Simmons, 2004; Martínez-Culebras, Barrio, García, & Querol, 2000; Weeds et al., 2003).

3.7.2.2. Polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD)

La técnica para detectar polimorfismo en el ADN amplificado al azar (RAPD) es un método basado en la PCR, en el que se emplea un cebador corto (generalmente, de 10 bases) para amplificar porciones anónimas de ADN con al menos un 50% de contenido de GC (Williams et al., 1990). Con esta técnica no se busca ningún fragmento de ADN específico, ya que el cebador se adherirá al ADN patrón en secuencias complementarias de ubicación desconocida. En consecuencia, no se conocerá la naturaleza de los productos obtenidos. Los fragmentos de ADN así generados se separan y se detectan mediante electroforesis (Williams et al., 1990)

Este enfoque se ha aplicado principalmente en la sistemática molecular al nivel de las especies o para estudiar la estructura genética de las poblaciones (Weising et al., 2005). Sin embargo, en este método se usan cantidades diminutas de ADN que son suficientes, pero el ADN debe estar limpio y su peso molecular debe ser elevado; si no es posible obtener un ADN de calidad mínima, será difícil garantizar la reproducibilidad de los resultados (Weising et al., 2005).

3.7.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores de microsatélites (MP / AMPPCR)

Para esta técnica existen diferentes acrónimos, es decir, reacción de amplificación con cebadores individuales (SPAR), Los marcadores Inter-Secuencias Simples Repetitivas (ISSRs) son dominantes y su iniciador para PCR está compuesto de una secuencia microsatélite como (GACA)_n anclada al extremo 3' o 5' por dos a cuatro nucleótidos

arbitrarios usualmente degenerados (ISSR-PCR) y PCR iniciada con mirosatélites (MP-PCR) y PCR iniciada con microsatélites anclados (AMP-PCR). (Weising et al., 2005)

La técnica utiliza un solo cebador (16-25 pb Largo) en la reacción de PCR que amplifica secuencias entre microsatélites en múltiples loci en todo el genoma. Los cebadores son anudados o anclado en el extremo 5' o 3' de una región de repetición y se extiende hacia el región repetida.

Los cebadores se diseñan a base de di-, tri- y tetra nucleótidos en tandem se repite (Weising et al., 1995, 2005). Se obtienen más bandas reproducibles por este método que mediante el uso de RAPD Marcadores (Weising et al., 2005). Los productos amplificados por PCR se separan en geles de agarosa o de poliacrilamida que se visualizan después de etidio Bromuro o tinción con plata, respectivamente o cualquier otro buffer de carga más amigable en el manejo.

3.8. Técnicas moleculares para el establecimiento de la diversidad y estructura genética.

La biología molecular ha jugado un rol muy importante en la conservación, caracterización y estudios de diversidad genética. Esto debido a la implementación de técnicas en especial los marcadores moleculares que han permitido poner al descubierto la variabilidad genética oculta en los genes. Entre las técnicas disponibles para estudiar la diversidad genética vegetal se encuentran los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment length polymorphism), Microsatélites y RAM (Random Amplified Microsatellites)(M. M. Abang et al., 2006)

En la identificación de individuos estrechamente relacionados, clones o cultivares se estima que los microsatelites tienen poder de discriminación siete veces mayor que los RAPD (Kraic, Žáková, & Gregova, 1998) y se consideran los marcadores ideales para estudios de mapeo de ligamiento y evolutivos (Hearne, Ghosh, & Todd, 1992; Morgante & Olivieri, 1993). En plantas los oligonucleótidos, compuestos por elementos repetitivos del tipo TG y GATA/GACA, detectan polimorfismo cuando se utilizan como sondas de RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) los sitios de microsatelites se distribuyen ampliamente con

una frecuencia de 1 cada 50.000 pares de bases; se presentan en 34 especies vegetales y el elemento repetitivo más común es el di nucleótido AT (Morgante & Olivieri, 1993) de igual manera la utilización de las técnicas AP-PCR (PCR con cebadores arbitrarios) y RAPD-PCR (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente) establecieron la asignación de subgrupos a las especies de *Colletotrichum* estudiadas (Afanador-Kafuri, Minz, Maymon, & Freeman, 2003; Brown, Sreenivasaprasad, Timmer, 1996; Cano et al., 2004; White, Bruns, Lee, Taylor, 1990).

Las herramientas moleculares han demostrado su utilidad en esclarecer el tipo de relaciones ecológicas y sistemáticas existentes entre aislamientos de *C. gloeosporioides*. Los niveles de variabilidad morfológica han resultado ser bajos, sin embargo la utilización de técnicas moleculares como MP-PCR permitieron diferenciar aislamientos con base a la patogenicidad y establecer relaciones con los niveles de virulencia (Abang et al., 2006; Abang, Fagbola, Smalla, & Winter, 2005; Abang, 2003). Además, estudios como los de Correa, Lavalett, Galindo & Afanador (2007) y Abang et al. (2002) muestran la identificación, mediante PCR, de *C. gloeosporioides* aislados a partir de ñame y Abang et al., (2006) en estudios mas recientes muestran resultados prolijos donde se determinó la variabilidad entre aislados de *C. gloeosporioides* de diferentes especies de ñame utilizando MP-PCR (Nguyen, Pettersson, Olsson, & Liljeroth, 2010; Nguyen, Säll, Bryngelsson, & Liljeroth, 2009).

4. METODOLOGÍA.

4.1. Tipo de estudio.

El tipo de conocimiento de esta investigación es exploratorio, descriptivo y evaluativo.

4.2. Generalidades De La Investigación

Esta investigación está enmarcada dentro del proyecto: “Caracterización Morfológica, Genética y Patogénica De *Colletotrichum gloeosporioides* Aislados A Partir De Muestras Sintomáticas De *Dioscorea alata* Var. Oso Y Diamante 22 en la Región Caribe”. ”Se desarrolló de junio 2013 a Julio de 2017 e incluyó una fase de campo en los departamentos de Sucre, Córdoba y Bolívar en los cuales se llevó a cabo, la colecta de muestras. La fase de laboratorio, fue llevada a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad De Sucre (Caracterización morfo-métrica y caracterización molecular).

Para llevar a cabo este proyecto se tomaron como foco de interés sitios de muestreo que son importantes en cuanto a poblaciones de producción de ñame correspondiente a la costa Caribe Colombiana debido a su área y ubicación los cuatro (4) sitios de muestreo los corregimientos de La Siria municipio de Toluviejo, Mateo Pérez municipio Sampués en el Departamento de Sucre; vereda la Salada, municipio de Chinú en departamento de Córdoba, y municipio de San Jacinto en el departamento de Bolívar. Estos sitios, están reconocidos y establecidos como zonas productoras de ñame del país (Aranza, 2012). Una de las características que demarcan estos sitios, es que estas zonas difieren entre sí en cuanto a su producción y condiciones ambientales (Tafur et al., 2006).

4.3. Fase De Campo

La fase de campo involucro expediciones a los sitios descritos (Figura6), en las cuales se realizó un muestreo aleatorio, con un recorrido en zic-zac; los individuos muestreados estaban con presencia del patógeno en su material foliar (López & Gamero, 1998). De los individuos muestreados (20 individuos para cuatro zonas de muestreo), se tomaron muestras de nueve características de las cuales tres fueron cuantitativas (Sutton, 1980).

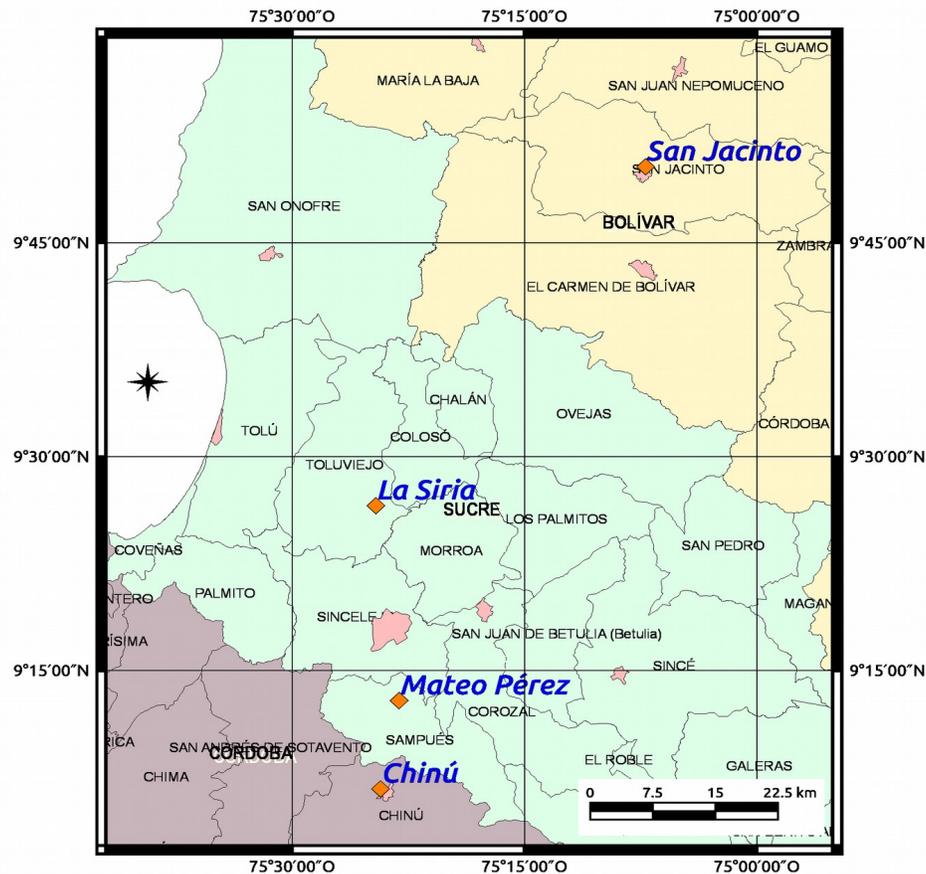


Figura 6: Localización de los sitios de estudio. Fuente (Autor)

4.4. Fase De Laboratorio

4.4.1. Caracterización Morfológica

Los aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos fueron subcultivados en medio sólido PDA con el fin de corroborar las características microscópicas y taxonómicas de género en estudio. Para la evaluación morfo-métrica se utilizó una lista de descriptores publicados por Sutton, (1980) para el género *Colletotrichum*, en esta evaluación se empleó microscopía de luz, y examen directo en lámina con lactofenol o azul de algodón de estos cultivos en lámina. Los descriptores cuantitativos registrados y publicados fueron un total de tres (tasas de crecimiento, porcentaje de esporulación y tamaño del conidio) y seis cualitativos (color de la colonia, color, aspecto y crecimiento del micelio y forma y color de la conidia). A partir de cada una de las muestras obtenidas en campo se les realizó las siguientes mediciones, que fueron: tasas de crecimiento (medición del diámetro del micelio con un Calibrador Vernier Mitutoyo 200 Mm 8 Inch, en ambos ejes) cada 24 h por 8 días, el porcentaje de esporulación mediante una cámara Neubauer y el tamaño del conidio con Micrometro ocular adaptado a ocular de 10x con objetivo de 100x.

4.4.2. Mantenimiento de los Aislamientos.

Para mantener siempre colonias jóvenes se realizarán subcultivos periódicamente o cada vez que se requiera, usando para esto el medio PDA, inoculando fragmentos del sustrato más colonias del hongo, los cuales se incuban y se mantuvieron por 7 días a 28°C bajo oscuridad constante.

4.4.3. Extracción de ADN Total.

La extracción del ADN total, se llevó a cabo a partir de los diferentes aislados de la colección del género *Colletotrichum* spp. El ADN fue extraído a partir del micelio fresco, obtenido del crecimiento del hongo en medio líquido Saboraud (Leslie & Summerell, 2008), para lo cual se utilizaron cultivos monospóricos, de aproximadamente 10 días. La extracción fue realizada utilizando el siguiente protocolo: El material previamente deshidratado aproximadamente 30 mg, se maceró en un mortero estéril con nitrógeno líquido, las muestras fueron colocadas en tubos de eppendorf de 1.5 µL, luego, a cada muestra se le agregó 600 µl de buffer de extracción (0.5M NaCl, Tris 0.2M pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8.0, SDS 1%) se mezcla e incuba a 60°C por una hora con inversiones de 5 minutos cada 20 min. Después se agregó 150 µL de acetato de amonio 4 M mezclado durante 15 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos. Se transfirió el sobrenadante y se le agregó 300 µl de cloroformo: alcohol isóamilico (24:1) mezclando durante 15 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos. Se transfirió el sobrenadante y se agregó ½ volumen de isopropanol frío, se dejó precipitando en el congelador por 24 h a 4°C pasado este tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se conserva el pellet, al cual se le agregó 250 µl de etanol frío y se mezcló por inversión de 2 a 3 minutos y luego se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se repite el lavado con etanol, finalmente se diluyó el pellet en 100 µl buffer TE (10 mM Tris y 1 mM EDTA) y se almacenó hasta su uso en congelador a -70°C (Afanador-Kafuri et al., 2003).

4.4.4. Cuantificación de ADN genómico total

La cuantificación del ADN total extraído se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific a una absorbancia de 260 nm. La medida de la pureza se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm, donde un coeficiente de absorbancia 260/280 de 1.8 indica que la solución es de ADN puro.

4.4.5. Electroforesis de ADN extraído en gel de agarosa

Se usaron geles de agarosa estándar preparados en buffer de electroforesis TBE 1X (1% P/V) en los que se sembró cada muestra usando como buffer de carga 3 µl de orange G y 7 µl de ADN y se corrió a 80 V durante 30 minutos en un tanque de electroforesis marca BIORAD OWL (Modelo B1) y se observó la presencia de ADN a través del transiluminador UV(UWR internacional), a una longitud e onda de 302 nm, adicionándole Gel red Nucleic Acid Gel Stain al momento de preparar el gel de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

4.4.6. Amplificación mediante PCR.

Con el fin de confirmar el género y determinar la especie de cada aislamiento se realizó una amplificación con marcadores específicos para *C. gloeosporioides* ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990) y (CgInt) (GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG) (Brown et al., 1996). Las condiciones de la PCR que se usó para amplificar los marcadores fueron las descritas por Freeman *et al.* (2001). Las concentraciones finales de los reactivos para la amplificación fueron las siguientes: buffer 1X, MgCl 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, cebadores 0,15 µM, una unidad de Taq Polimerasa (Thermo Scientific), 0.2 mg/ml BSA y 20 ng/µl de ADN muestra en un volumen final de 10 µl. Se incluyó un control negativo donde la reacción no contenía muestra de ADN (Tabla 2). La programación del termociclador (C1000™ de BIO-RAD) correspondió a un ciclo inicial de 4 min a 94°C, 39 ciclos de amplificación (desnaturalización por 30 seg a 94°C, anillamiento por 30 s a 55°C y extensión por 1 min a 72°C) y un ciclo de extensión por 6 min a 72°C(Tabla 3). Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, teñidos con SYBR® 2 Safe (Invitrogen).

Tabla 2 Concentraciones de los reactivos empleados en la PCR.

Reactivos	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR	1X	1,2
BSA	0,2 mg/mL	2,4
MgCl ₂	1,5 mM	0,36
dNTP mix	0,2 mM	0,24
Taqpol	1U	0,24
Cebador 1	0,15 μM	0,18
Cebador 2	0,15 μM	0,18
ADN	20 ng	0,4
Total de Reactivos		4,8
Agua ultra pura		4,8
Volumen/ Reacción		10

Tabla 3 Ciclos de amplificación de la PCR (Temperatura y Tiempos).

Etapas	Números de ciclos	Temperatura($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (Seg)
Desnaturalización inicial	1	94	240
Desnaturalización		94	30
Apareamiento	39	55	30
Extensión		72	60
Elongación	1	72	360
Extensión final	1	4	∞

4.4.7. Análisis de la estructura y Diversidad genética.

Para establecer el análisis de la estructura y Diversidad genética se utilizó la técnica microsatellite-primed PCR (MP- PCR), para la cual a partir del ADN extraído de los aislados de *C. gloeosporioides*, confirmados previamente por PCR, se procedió a realizar la amplificación utilizando un conjunto de cuatro cebadores denominados: (CAC)⁵, (CTG)⁵, (GACA)⁴, y (GACAC)³ (Freeman, Minz, Jurkevitch, Maymon, & Shabi, 2000); Abang, 2003; Freeman et al., 2000; Freeman, Minz, Maymon, & Zveibil, 2001) (Tabla 4) empleados por su buena resolución y resultados reproducibles en aislamientos de la especie *C. gloeosporioides*.

La reacción MP- PCR, se realizó siguiendo lo descrito por Freeman et al, (2001) con modificaciones, en la adición de reactivos con el fin de eliminar elementos presentes en la diluciones del ADN producto de la extracción. Se preparó un volumen final de 10 µL con un ADN compuesto de 12 ng. El procedimiento utilizado para la implicación de los MP-PCR fue la siguiente: buffer 1X, MgCl 3,7 mM, dNTP 0,15 mM, cebadores 0,4 µM, una unidad de Taq Polimerasa (Thermo Scientific) y 0.2 mg/ml BSA (Tabla 6). Se incluyó un control negativo en la reacción para cada iniciador, al cual no se le agregó muestra de ADN. El programa de amplificación correspondió a una incubación inicial de 4 min a 94°C, seguido de 39 ciclos con una desnaturalización de 5 s a 94°C, anillamiento a 48°C por 30 s y extensión a 72°C durante 30 segundo y una extensión final de 72°C durante 7min (Tabla 5) (Afanador-Kafuri et al., 2003; Freeman y Katan, 1997; Freeman & Rodriguez, 1995).

Tabla 4 Códigos y secuencias de los cebadores utilizados en el MP-PCR.

Código	Secuencia	Fuentes bibliográfica
CAC	5'-CACCACCACCACCAC -3'	(Freeman et al., 2001)
CTG	5'-CTGCTGCTGCTGCTG- 3'	(Freeman et al., 2001)
GACAC	5'-GACACGACACGACAC- 3'	(Freeman et al., 2001)
GACA	5'-GACAGACAGACAGACA- 3'	(Freeman et al., 2001)

Tabla 5 Ciclos de amplificación de MP – PCR (Temperatura y Tiempo).

Etapas	Número de Ciclos	Temperatura(°C)	Tiempo (Seg)
Desnaturalización inicial	1	94	240
Desnaturalización		94	5
Apareamiento	39	48	30
Extensión		72	30
Elongación	1	72	420
Extensión final	1	4	∞

Tabla 6 Concentraciones de reactivos empleados en el MP- PCR.

Reactivos	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	1X	2,1
BSA	0,2 mg/mL	4,2
MgCl ₂	3,7 mM	1,55
dNTP mix	0,15 mM	0,315
Taqpol	1 U	0,42
Cebador 1	0,4 µM	0,84
ADN	12 ng	1,2
Total de Reactivos		4,4
Agua		4,4
Volumen/ Reacción		10

4.4.8. Visualización de los productos de amplificación de loci microsatellite-primed PCR (MP-PCR)

Los productos de amplificación se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa 3.5%, en los que se sembró cada muestra usando como buffer de carga 1 µL de azul de bromo fenol, xilencianol y glicerina (Sambrook & Russell, 2001) y 5 µL de producto amplificado y se corrió a 50V durante 90 minutos. El ADN se visualizó con el colorante Gel red Nucleic Acid Gel Stain. El tamaño de los fragmentos de amplificación se determinó utilizando un marcador de peso molecular Gene ruler 100bp Plus DNA ladder de Thermo Scientific con un rango de 100 a 3000bp. Los resultados fueron digitalizados utilizando una cámara Cannon Powershot A220 HD (Abang, 2003; Freeman & Katan, 1997; Freeman et al., 2000).

Para la determinar de la composición alélica de los individuos en estudio, se utilizaron diferentes procedimientos independientes, cuyos resultados luego fueron contrastados con el fin de garantizar la robustez de los análisis. El primero consistió en hacer la lectura directa de los alelos correspondientes a las bandas de amplificación que eran observables en la

electroforesis. Esto mediante una impresión en papel de fotografía. Finalmente el método más refinado consistió en la utilización del programa GelAnalyzer (Lazar & Lazar, 2010), el cual mediante herramientas de procedimiento gráfico permite la corrección de imperfecciones típicas de la corrida electroforética con ajuste de los valores Rf, así como la cuantificación exacta de los alelos presentes mediante la comparación con un marcador de peso conocido.

4.5. Procesamiento estadístico.

Para apoyar las observaciones morfológicas se codificó una matriz de datos multiestado a una matriz binaria, basada en: 1) características macroscópicas diferenciales, 2) características microscópicas diferenciales entre cepas. Se computaron los datos utilizando el paquete estadístico NTSYS – pc 2.1 (Rohlf, 1992), realizando un análisis de correspondencia múltiple (ACM).

Para la información molecular, en las fotografías de los geles solo se tuvieron en cuenta aquellas bandas producto de la amplificación que fueron más visibles y reproducibles. Cada locus se enumeró en orden descendente tomando como referencia su respectivo peso molecular estimado por comparación con el marcador de peso molecular.

4.5.1. Análisis de datos Morfológicos y Moleculares

Los fragmentos generados por el resultado molecular MP-PCR fueron analizados como caracteres independientes. Todos aquellos fragmentos que presentaron igual tamaño se asumieron que pertenecen al mismo locus es decir a la misma secuencia. La información se evaluó como presente con un valor de 1 o ausente con un valor de 0. La información producto de lectura de los geles de MP-PCR, fue consignada en una matriz de datos tipo Excel y usada en el análisis de parámetros de diversidad y estructura poblacional (AMOVA) (Garcia-Mas, Oliver, Gomez-Paniagua, & De Vicente, 2000; Karp, Ingram, & Isaac, 2012) utilizando el programa de computador POPGENE, y GelAnalyzer (Lazar & Lazar, 2010; Yeh, Yang, Boyle, Ye, & Mao, 1997) El cual mediante herramientas de procesamiento gráfico permite la correlación de imperfecciones típicas de la corrida electroforética incluyendo el

ajuste de los valores Rf, permitiendo así la cuantificación exacta de los alelos presentes mediante la comparación con un marcador de peso conocido.

Los datos morfológicos fueron sometidos a análisis jerárquicos de una sola vía (ANOVA) y análisis Jerárquicos (Tukey).

Para examinar la distribución de los marcadores moleculares se utilizó el programa GEN ALEX (Peakall & Smouse, 2001), este análisis incluyó frecuencias alélicas correlacionadas con permutaciones de 1.000.000 de probabilidad con una viabilidad del 99.5% el índice ΔK se realizó con permutaciones de 100.000.000 repeticiones MCMC y 100.000.000 de longitud burn-in. La probabilidad de K Varío entre 1 y 10, cada procedimiento se repitió diez veces. El valor real de las poblaciones se obtuvo a partir de la estimación de ΔK , según el método de Evanno et al. (2005).

Para determinar las relaciones entre los diversos aislamientos del hongo en estudio se realizó un análisis de agrupamiento utilizando un análisis de correspondencia múltiple, a partir de la información molecular y la de tipo morfológico. que se ha obtenido con las cepas en estudio, mediante le paquete estadístico NTSYS-PC versión 2.11 (Garcia-Mas et al., 2000; Rohlf, 1992).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización del agente causal de la antracnosis en ñame.

El proceso de verificación de características taxonómicas de los aislados presentes en la colección de hongos de la Universidad de Sucre permitió la identificación por reconocimiento macro y microscópico de 20 aislamientos provenientes de diferentes sitios de colectas de los departamentos de Córdoba Sucre y Bolívar (Tabla 7). Los aislamientos identificados pertenecen del género *Colletotrichum* spp; mostraron características típicas del género tales como: conidias hialinas unicelulares con morfología cilindro-ovoide, acervulos subepidemicos con forma de disco de color oscuro y presencia de setas oscuras. Los acervulos emergen a través de la superficie; los conidióforos son cortos y erectos, Sutton (1992; 1998) características que permite sugerir la responsabilidad de este género en el desarrollo de los síntomas asociados a antracnosis en ñame (Figura 7).

Tabla 7 Procedencia de los aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* obtenidos de tres zonas agroecológicas del caribe Colombiano.

Departamento	Ubicación geográfica		Hospedero		Aislamiento	Año
	Municipio	Sitio de Colecta	Especie	Variedad		
Bolívar	San Jacinto	Nápoles-Venecia	<i>C. gloeosporioides</i>	Oso	6	2009
				D22	132	2009
				D22	465	2009
				D22	466	2009
Córdoba	Chinú	Los Algarrobos	<i>C. gloeosporioides</i>	D22	22	2009
				Oso	23	2009
				D22	28	2009
				D22	29	2009
				D22	187	2009
				Oso	1247	2009
Sucre	Tolúviejo	La siria	<i>C. gloeosporioides</i>	D22	47	2012
				D22	101	2012
				D22	74	2012
				D22	70	2012
				D22	71	2012
				D22	69	2012
	D22	133	2012			
	Sampues	Mateo Perez	<i>C. gloeosporioides</i>	Oso	388	2012
			Boton	20	2012	

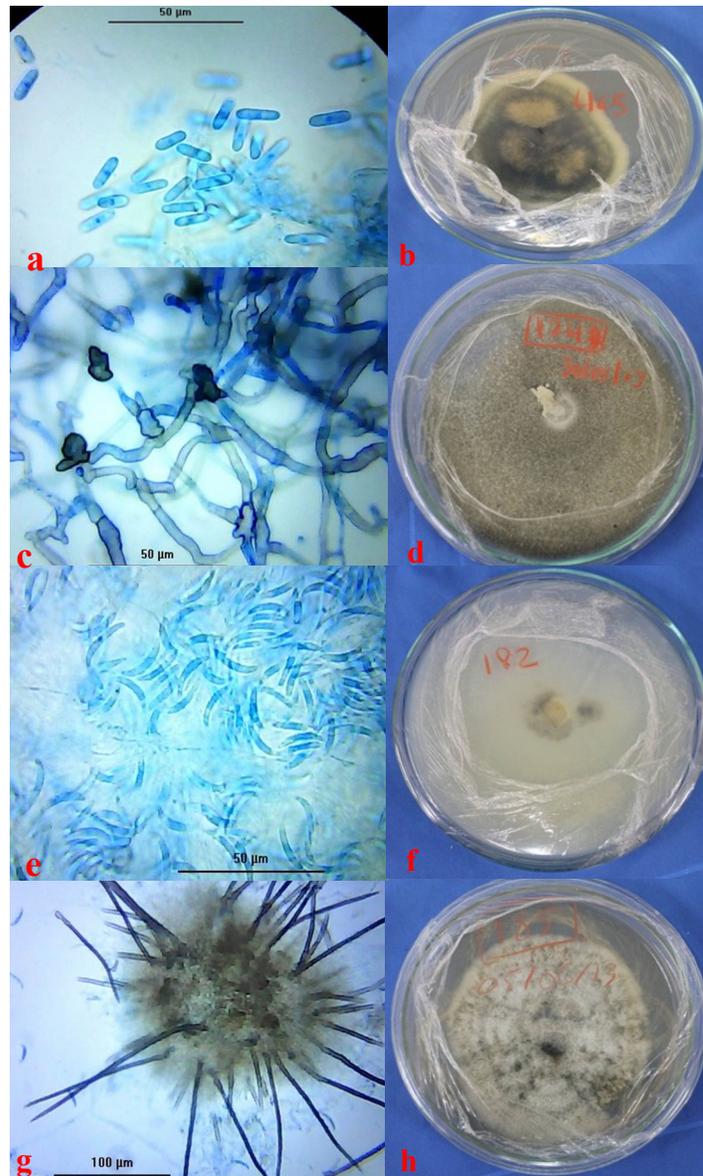


Figura 7: Registro macroscópico y microscópico de algunos aislados del género *Colletotrichum* spp usados en el estudio. **a:** conidios de *Colletotrichum gloesporioides*, **c:** apesorios, **e:** conidios de *Colletotrichum acutatum*, **g:** setas de *Colletotrichum acutatum* **b,d,f & h:** Característica macroscópica de cada cepa correspondiente

Los 20 aislamientos seleccionados pertenecientes a los cuatro sitios de muestreos se le realizó una caracterización morfológica a partir de caracteres tanto cuantitativos (tasa de crecimiento, porcentaje de esporulación y tamaño de conidio) y cualitativos (Color de la colonia, Color, aspecto y tipo de micelio y forma y color de la conidia).

En cuanto a los cualitativos, el examen morfológico de estos aislamientos de *Colletotrichum* reveló un gran nivel de variación, resultados antes descritos por Sutton y Sanhuesa (1992; 1998). La mayoría de los aislados tenían conidios rectos y cilíndricos que en general encaja en la comúnmente aceptada descripción de *C. gloeosporioides* (Mordue, 1971; Sutton, 1980) (Mordue, 1971; Sutton, 1980). Sin embargo, entre los aislamientos se observaron algunos que tenían conidios que eran acuminado en un extremo y, por tanto, tenían características de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Figura 7) de igual manera se observaron aislados con conidias falcadas que presentaban vacuola, y observándose diferencias marcadas en la prueba de tasa de crecimiento. Esta prueba logro separar claramente los aislamientos que presentaban conidios cilíndricos del grupo de aislamientos que presentaban conidios fusiformes.

Para los caracteres morfológicos cuantitativos se evaluaron tasa de crecimiento, esporulación y tamaño de conidio. (Figura 8 y Anexo C), estos datos se sometieron a comparación, es así que mediante análisis de varianza se determinó que los caracteres evaluados no presentaron diferencia estadística significativa, entre los diferentes aislados estudiados (Figura 9 y Tabla 12), Sin embargo las diferencias en la tasa de crecimiento entre especies de *Colletotrichum* han sido reportadas por diferentes grupos de científicos, los cuales señalan la necesidad de una prueba de diagnóstico fiable capaz de separar especies, que presentan morfología intermedia (Simmonds, 1965; Smith et al., 1990; Vinnere et al., 2002). Al igual que en estudios anteriores, el aislado con conidios fusiformes creció más lentamente que aquellos con conidios cilíndricos.

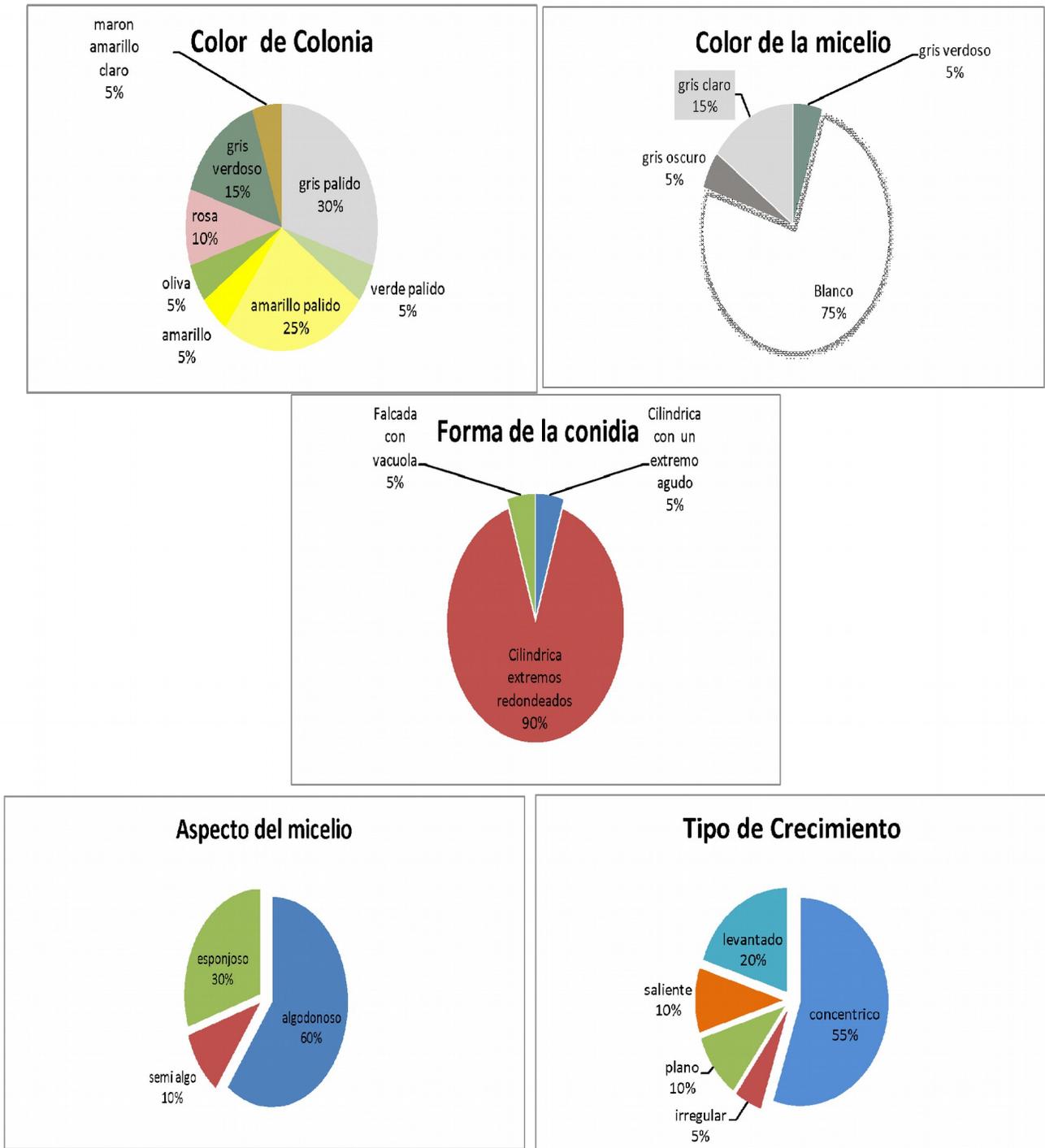


Figura 8: Variación de los caracteres morfológicos observados en los 20 aislados de *C. gloeosporioides* expresadas en porcentajes.

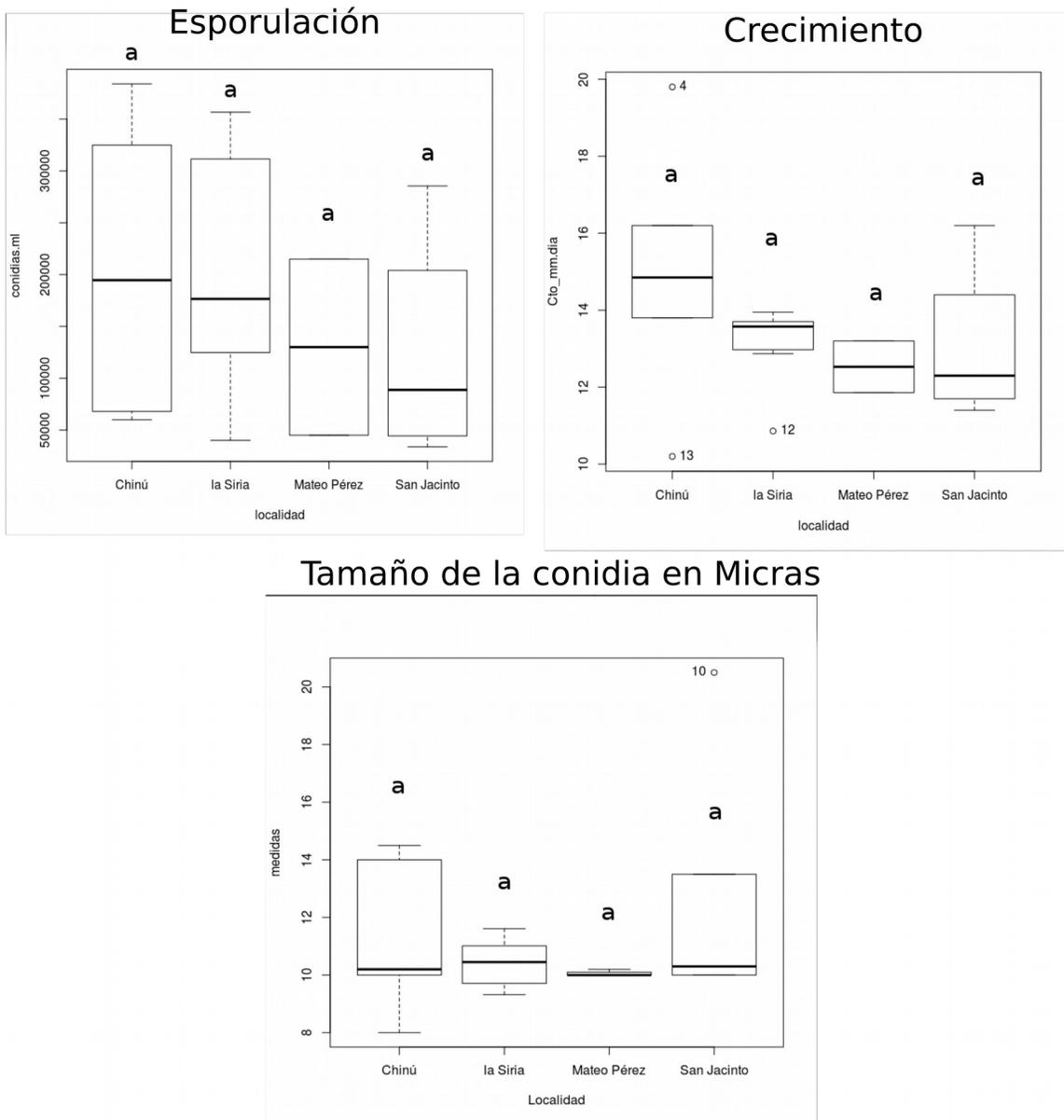


Figura 9: Comparación de 3 caracteres morfométricos de aislados de *C. gloeosporioides* mediante test de Tukey ($\alpha=0,05$) en cuatro sitios de muestreos del Caribe Colombiano.

Tabla 8 Comparación de 3 caracteres morfométricos de aislados de *C. gloeosporioides* mediante test de Tukey ($\alpha=0,05$) en cuatro sitios de muestreos del Caribe Colombiano.

Localidad	Parámetro (Média±D. Estandar)		
	Esporulación (N°)	Crecimiento (mm/día)	Tamaño Conidia (μm)
Chinú	204375±138920,5 ^a	14,9±3,1659122 ^a	11,15±2,5485290 ^a
La Siria	202771±117070,7 ^a	13,1±0,9964365 ^a	10,37±0,8187363 ^a
Mateo Pérez	130000±120208,2 ^a	12,5±0,9475231 ^a	10,06±0,1154701 ^a
San Jacinto	124187±114003,5 ^a	13,0±2,1563859 ^a	12,86±4,5191813 ^a

Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

Como estos métodos convencionales no permiten identificar los aislados a nivel de especies, se procedió a métodos moleculares que permitieron confirmar la presencia de *C. gloeosporioides*, especie reportada como agente causal de antracnosis en ñame (Abang et al., 2002; Abang, 2003; Agrios, 2012; Amusa et al., 2005; Cerón Rincón et al., 2006; Pinzón, 2014).

5.1.1. Análisis de correspondencia múltiple de los caracteres morfométricos

Mediante un análisis multifactorial de agrupación donde se emplearon todos los datos obtenidos de las mediciones de tasa de crecimiento, porcentaje de esporulación y tamaño de conidia, se muestra que según los valores y los rangos establecidos de similitud hay una (1) población bien diferenciada entre los cuatro sitios muestreados. Es decir que existe una sola población de hongos (*Colletotrichum gloeosporioides*) distribuida en las tres zonas agroecológicas de influencia en el proyecto (Figura 10).

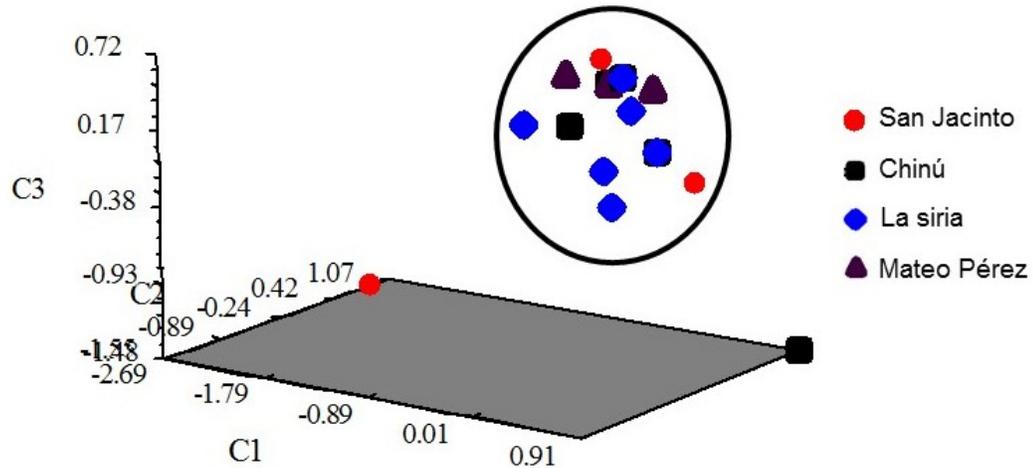


Figura 10: ACM de individuos de *Colletotrichum gloeosporioides* con base en tres características morfológicas, para los cuatro sitios de muestreos.

5.2. Caracterización molecular por PCR de la especie

5.2.1. Extracción y determinación de la pureza del ADN

Al utilizar el método de extracción de ADN descrito por Afanador-Kafuri et al. (2003), se obtuvo suficiente ADN, el cual fue verificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, la pureza se determinó mediante la utilización de un equipo de cuantificación, el cual utiliza el espectro de luz ultravioleta a la cual el ADN absorbe energía, y mediante un fotoreceptor que es capaz de establecer si el ADN es puro o presenta contaminantes, con base a la cantidad de luz que es absorbida y tramitada por la solución de ADN, y esto se establece mediante una relación de absorbancia a 260nm y 280nm, y el resultado de esta proporción en sí, es la calidad del ADN. Las muestras que presentaron la mejor proporción de pureza fueron seleccionadas para la determinación de variabilidad genética, los resultados de la

cuantificación del ADN fueron buenos ya que la concentración obtenida para las muestras oscilaron entre 110.1 y 5292.3 ng/ μ L y con una pureza promedio de 1,2 (260/208).

5.2.2. Reacción de amplificación del PCR específico

Para la identificación molecular el ADN se sometió a amplificación con marcadores específicos para *C. gloeosporioides* ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990) y (CgInt) (GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG) (Brown et al., 1996; Freeman et al., 2001; Mills, Sreenivasaprasad, & Brown, 1992) estos cebadores en conjunto amplifican un fragmento específico de 450-pb, y por la comparación entre secuencias de la región ITS (Regiones Espaciadoras Transcriptoras Internas) de especies de *Colletotrichum* y la posterior visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa, mostró fragmentos entre 450 y 500 pb (Figura 11). Resultados similares fueron obtenidos por Freeman et al, (2001) en sus estudios de caracterización y diversidad genética de *C. gloeosporioides* aislado de antracnosis en manzana, aguacate y fresa.

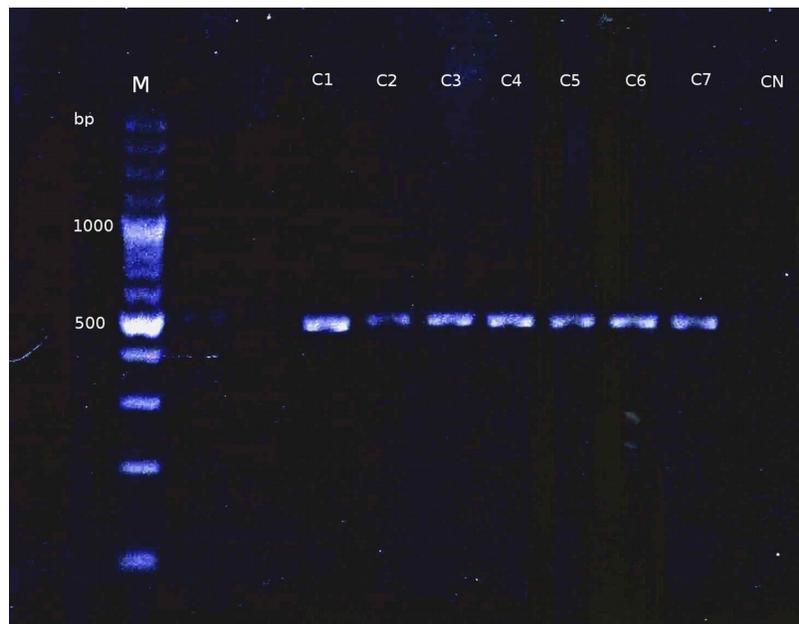


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del PCR específico para aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

M: Marcador de peso molecular, C1-C7: carril de la amplificación de aislados del *Colletotrichum gloeosporioides* asociados al cultivo de ñame con los cebadores ITS4 & CgInt, CN: carril del control Negativo.

La reacción de amplificación utilizó el protocolo de amplificación de Freeman et al. (2001) con modificaciones en sus ciclos de amplificación y concentración de los reactivos, tal cual se describe en la metodología (Tabla 2 y 3). Samarakoon, Wang, & Alford (2013) afirman que adiciones de proteínas estabilizadoras como BSA (albumina de suero bobino), permiten inhibir la acción de los iones, gracias a su alto contenido de lisina, permitiendo que estos se unan y no intervengan con la actividad de la polimerasa.

Igualmente se realizaron cambios en las concentraciones de Mg^{+2} , puesto que al optimizar la concentración se logró la amplificación de todas las muestras, siendo un co-factor imprescindible para el funcionamiento de la polimerasa, y su concentración óptima varió dependiendo de cada cebador utilizado en la reacción.

5.2.3. Polimorfismo de adn amplificados por MP-PCR.

Del total de 10 cebadores utilizados dieron resultados consistentes cuatro de ellos (CAC)₅, (CTG)₅, (GACAC)₃ y (GACA)₄ (Freeman & Katan, 1997; Freeman & Rodriguez, 1995; Freeman et al., 1998, 2000). El resto de cebadores fueron descartados por presentar problemas de amplificación, resultados inconsistente o desequilibrio de ligamiento entre otros (Selkoe & Toonen, 2006).

A partir de cada una de las cepas del hongo en los que se comprobó la presencia de ADN por electroforesis, y se identificó positivamente como perteneciente a la especie *C. gloeosporioides*, a través de la PCR con cebadores específicos de especies, se procedió a realizar la amplificación utilizando el conjunto de cebadores, seleccionando aquellos que

reflejaron alto polimorfismo, una buena calidad de resolución y bandas diferenciables en otros ensayos (Tabla 4).

Las reacciones de MP-PCR se llevaron a cabo en un termociclador BIORAD, para tubos de 0.2 mL, utilizando el método descrito por (Freeman et al., 2001) con modificaciones en los ciclos de amplificación y concentraciones de los reactivos empleados en dicho procesos, tal y como se indica (Tabla 5 y 6).

Partiendo de la matriz binaria (ausencia – presencia) obtenida a partir de los resultados de la electroforesis se calcularon los índices para determinar variables genéticas de interés, determinando el grado de diversidad genética y estructura poblacional.

Los cuatro cebadores evaluados, tuvieron un criterio de selección basados principalmente en la reproducibilidad de los perfiles, la intensidad y nitidez de los fragmentos generados, esta cifra de cebadores valorados, es similar al número utilizados en otros estudios realizados en hongos como los realizados por Durand et al. (2009); Kumar, et al. (2011); Muniz, et al. (1997) e inferior a los utilizados por Oliveira et al. (2013).

Los marcadores capaces de detectar polimorfismos son esenciales para determinar variabilidad en poblaciones de estudio, constituyendo una ventaja, siendo capaz de detectar variabilidad, aun con un número reducido de muestras (mínimo 20 individuos) (Abang, 2003; Franco, Crossa, Warburton, & Taba, 2006; Warburton et al., 2002).

Como resultado del análisis de 4 cebadores tipo MP- PCR, utilizados para amplificar fragmentos de ADN de 20 OTU's de *C. gloeosporioides* en 4 localidades de la Costa Caribe Colombiana, se produjeron un total de 76 fenotipos, con un promedio de alrededor de 19 fenotipos por cebador, el peso molecular de los fenotipos amplificados fue de entre 650pb y 2460pb.

Presentándose variaciones en la cantidad de polimorfismos presente en los distintos cebadores. El cebador que presentó mayor grado de polimorfismo fue GACAC (29 fenotipos) con un 35,65% de amplificación a través de las 20 OTU's y el cebador que mostró menor polimorfismo fue CAC (9 fenotipos) con un 8,83%. Franco et al. (2006) sugiere que el rango esperado para el contenido de información polimórfica está entre 0.01 a 1, siendo el valor 0,01 reservado para aquellos marcadores con la menor capacidad polimórfica, y el valor de 1 para los cebadores con una elevada capacidad polimórfica, los mayores valores de contenido de información polimórfica (PIC) fueron obtenidos con los cebadores GACAC (0,19), siendo el peso de los fenotipo 282pb - 1267pb, ambos con el mismo valor polimórfico.

Por consiguiente, el cebador GACAC es el más informativo y útil para subsecuentes estudios de caracterización, la capacidad que tiene cada uno de los cebadores empleados para evaluar el contenido de información polimórfica ($=0,12$) y el número de bandas polimórficas (porcentaje de polimorfismos), es similar, esto nos indica que todos los cebadores tienen la misma eficacia en la evaluación de la variabilidad genética de *C. gloeosporioides*.

5.3. Diversidad genética

5.3.1. Flujo de Genes

El flujo genético es definido como la difusión lenta de genes a través de una barrera racial. Es un proceso que involucra a una población más o menos grande de individuos, junto con un cambio gradual en sus frecuencias genéticas. El flujo genético entre poblaciones (Nm), donde N es el tamaño de la población y m es la fracción de individuos en una población que son migrantes, se estimó por sustitución de Nei's G_{st} del modelo de flujo génico de Wright (1978), Utilizando una versión corregida para haploides así: $NM=0,5*[(1-G_{st})/G_{st}]$, (Boeger, Chen, & McDonald, 1993; McDonald & McDermott, 1993). Si $Nm \leq 1$, entonces las poblaciones locales tienden a diferenciarse; Si, $Nm \geq 1$, entonces habrá poca

diferenciación entre las poblaciones y la migración será más importante que la deriva genética (Wright, 1978).

En este estudio se estimó el número de migrantes (Nm), refiriendo con esto al movimiento de individuos entre las poblaciones, la población de Mateo Pérez y la Siria presentaron un número de migrantes por generación fue de 70, seguido de la población de Mateo Pérez y Chinú, que fue de 81,34 y en ese orden las poblaciones de Mateo Pérez y San Jacinto con 80,56, la población de la Siria y Chinú con 84,87, la población de la Siria y San Jacinto con 79,23 y por último las poblaciones de Chinú y San Jacinto con 83,54, el número de migrantes presentes en los sitios de muestreos no son diferentes para los sitios de muestreos estudiadas, el número es estadísticamente similar para todos (Tabla 9).

Esto determina que el flujo genético es suficiente para evitar los efectos de la deriva genética puesto que el Nm es ≥ 1 . La deriva genética es un efecto estocástico que es consecuencia del muestreo aleatorio en la reproducción y de la pérdida de unos alelos por azar y no por selección natural. Se trata de un cambio aleatorio en la frecuencia de alelos de una generación a otra. Normalmente se da una pérdida de los alelos menos frecuentes y una fijación (frecuencia próxima al 100%) de los más frecuentes, resultando una disminución en la diversidad genética de la población, que para este caso no ocurren, los resultados muestran el predominio de condiciones que han llevado a la disminución de la endogamia y es muy posible que refleje una situación favorable para las poblaciones de *Colletotrichum*, pero a su vez una situación negativa para los cultivos de ñame en el Caribe Colombiano, debido a que estos valores de heterocigocidad (H_e) se asocian a condiciones adecuadas del ambiente o condiciones que benefician el flujo genético y la supervivencia de los individuos de *Colletotrichum gloeosporioides* en cultivos de ñame en el Caribe Colombiano (Tabla 9).

Tabla 9 *Numero de migrantes entre las poblaciones.*

Comparación Inter-poblacional				
Comparación	Na	He	Nm	%Loci polimorfico
M. Pérez Vs Siria	0,02	0,0076	70	9,00%
M. Pérez Vs Chinu	0	0,00043	81,34	5,00%
M. Pérez Vs S. Jacinto	0	0,0035	80,56	5,00%
Siria Vs Chinu	0	0,00023	84,87	5,00%
Siria Vs S. Jacinto	0	0,00021	79,23	5,00%
Chinu Vs S. Jacinto	0	0,00012	83,54	5,00%

Na: Número de alelos diferentes

He: Heterocigocidad esperada

Nm: Número de migrantes

5.3.2. Distancia Genética

Podemos afirmar que poblaciones no fragmentadas y con alto flujo genético presentaran un paquete genético igual o similar, y al realizar la medida de la variabilidad genética inter-poblacional de distancias genéticas por el coeficiente de Nei (1972) permitió determinar que las poblaciones más similares fueron la población de Mateo Pérez y la San Jacinto presentando un coeficiente de 0,99943 (99,994%), al igual las poblaciones de la Siria y Chinu con el mismo valor, seguido de las poblaciones de San Jacinto y la Siria, y San Jacinto y Chinu con coeficiente de 0,9992 (99,992%), y en ese orden las poblaciones de Mateo Pérez y Chinu con coeficiente de 0,9993 (99,93%) (Tabla 10).

Tabla 10 Variabilidad genética inter-poblacional de distancias genéticas por el coeficiente de Nei.

Poblaciones	Coeficiente de Nei	Porcentaje de confiabilidad
Mateo Pérez -San Jacinto	0,99943	99,99%
La Siria - Chinú	0,99943	99,99%
San Jacinto -la Siria	0.9992	99,99%
San Jacinto -Chinú	0.9992	99,99%
Mateo Pérez -Chinú	0.9993	99,93%
Mateo Pérez -La Siria	0.9993	99,92%

Las poblaciones más diferentes son las poblaciones de Mateo Pérez y La Siria con coeficiente de 0,9993 (99,92%), en tal sentido el flujo de genes inter-poblacional se estableció la siguiente ruta: San Jacinto (Bolívar), siguiendo hasta Mateo Pérez (Sampues-Sucre), continuando su ruta por Chinú (Córdoba) hasta llegar a la Siria (Toluviejo-Sucre), de este modo se puede establecer que los datos moleculares confirman lo mencionado por Tafur et al. (2006) con respecto a los corredores de comercio, donde dice que las zonas fisiográficas comunes como son la Planicie del Caribe y la depresión Momposina en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar permiten construir el concepto de región a partir de subregiones físicas trascendiendo más allá de los simples límites departamentales, compartiendo así condiciones edafoclimáticas y de vínculos espaciales, particularmente los de tipo vial y de flujos económicos; condiciones que permiten la migración que conlleva al flujo de genes por dispersión del patógeno. (Figura 12) Condición que ya ha sido documentada ampliamente, (Abang et al., 2006; Abang, 2003; Amusa et al., 2005; Sanabria et al., 2010) refiriendo a que en el cultivo de ñame el intercambio del material de siembra que en general corresponde al tubérculo, por parte de los productores de la región, es considerado una de las principales fuentes de dispersión del patógeno, ya que en el tubérculo pueden reposar los conidios del hongo en forma de acérvulos, hasta encontrar las condiciones óptimas para su liberación, germinación y desarrollo (Abang et al., 2006).

De esta manera, el flujo génico encontrado determina la persistencia y adaptación de poblaciones locales de *Colletotrichum gloeosporioides* en el Caribe Colombiano, ya que el flujo génico entre poblaciones de esta especie es alto, entonces todas las poblaciones evolucionan de manera conjunta, es decir que las poblaciones de *C. gloeosporioides* han sufrido un proceso de evolución convergente, que evita el aislamiento reproductivo y en consecuencia el establecimiento de linajes evolutivamente independientes. Qué tanto flujo génico es necesario para prevenir la evolución independiente de las poblaciones de una especie dependerá de la intensidad de las otras fuerzas evolutivas (Eguiarte, 2009; Hedrick, 2005).

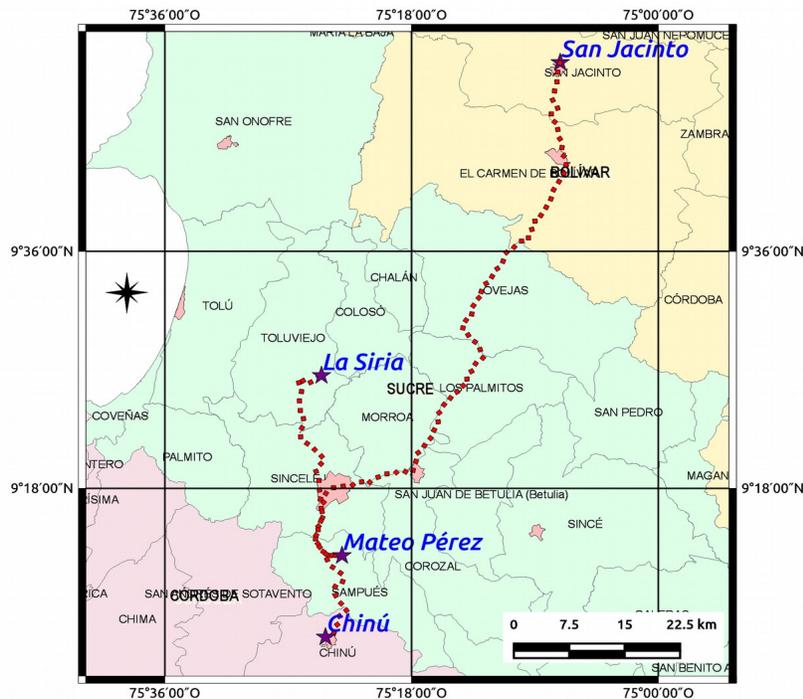


Figura 12: Corredor interno de Córdoba-Sucre-Bolívar adaptado según Tafur *et al.* 2006).

Para Montero *et al.*, (2010) esto puede tener su origen en diversos factores: el intenso tráfico existente en el germoplasma genera un intercambio del hongo, que se encuentra como infección latente (síntomas no visibles), igualmente la capacidad del hongo para reproducirse sexualmente, siendo además una especie heterotálica que incluye la meiosis como un tipo de reproducción y por consiguiente el entre-cruzamiento de segmentos cromosómicos que

junto con las mutaciones, podrían ser la mayor fuente de variabilidad del mismo, cuya fase sexual *Glomerella cingulata*, es ampliamente conocida, sin tener un papel reconocido en las epidemias de antracnosis en ñame (Abang et al., 2006). Otro factor, se atribuye a un alto potencial de dispersión y adhesión de las conidias y ascosporas de muchas especies del género *Colletotrichum*, las cuales están envueltas con una sustancia mucilaginosa hidrofílica, compuesta principalmente de polisacáridos y glicoproteínas de alto peso molecular, que le permite a las conidias mantener la viabilidad bajo condiciones adversas como temperaturas extremas, luz ultravioleta y baja humedad, al mismo tiempo, protege las esporas de los materiales tóxicos producidos por los tejidos vegetales hospederos durante el desarrollo de una lesión (Cerón et al., 2006; Crous et al., 2016).

La variación genética presente en *C. gloeosporioides* refleja la capacidad del patógeno para evolucionar y adaptarse a diferentes ambientes, aspecto que contribuye al alto grado de dificultad en el diseño de estrategias de control efectivas y duraderas, por lo que la búsqueda de variedades resistentes a la enfermedad ha sido sugerida como una estrategia potencial en el mejoramiento de la enfermedad, sin embargo, esta estrategia es apropiada si el patógeno es exclusivamente asexual y si el potencial de flujo de genes es bajo, pero si el patógeno es recombinante y tiene un alto potencial de flujo de genes, como parece ser el caso de *C. gloeosporioides* causante de antracnosis en ñame en el Caribe Colombiano, la recombinación de alelos de virulencia puede ocurrir tan rápido que los esfuerzos pueden ponerse en riesgo (Abang, 2003; Pinzón, 2014; Sanabria et al., 2010).

5.3.3. Composición Genética

5.3.3.1 Determinación de Delta de k (ΔK) y asignación de poblaciones genéticas.

Las poblaciones muestreadas, compartieron muchos fenotipos (“Nm”), tal como lo señala el número de migrantes (tabla 8), con esto, se asume que los hongos pueden dispersarse fácilmente debido a las preferencias de los agricultores por el hospedero. Los resultados

sugieren una baja diversidad genética entre poblaciones muestreadas, sugiriendo que las poblaciones no están aisladas, ni genética, ni geográficamente las unas de las otras, mediante un análisis basado en el método establecido por Falush et al. (2007) se logró identificar que las cuatro poblaciones muestreadas constituyen genéticamente solo una con el 80% de ΔK . (Figura 13).



Figura 13: Estimación del número de poblaciones genéticas con base a cuatro loci MP-PCR en 3 zonas del Caribe Colombiano (Earl & Vonholdt, 2012).

Las poblaciones en estudio fueron sometidas a un análisis inferencia bayesiana (Figura 14), con el fin de determinar la composición genética de cada una de ellas y la asignación de los individuos a poblaciones genéticas específicas. Este análisis se hizo independiente de la localidad de origen y las características morfológicas. Cada línea es un individuo y la proporción de los colores (rojo), corresponde a la probabilidad de asignación a cada población genética formada. El resultado muestra que no existen diferencias genéticas, suficiente para determinar que existe solo una población genética, compuesta por individuos que comparten alelos entre sí.

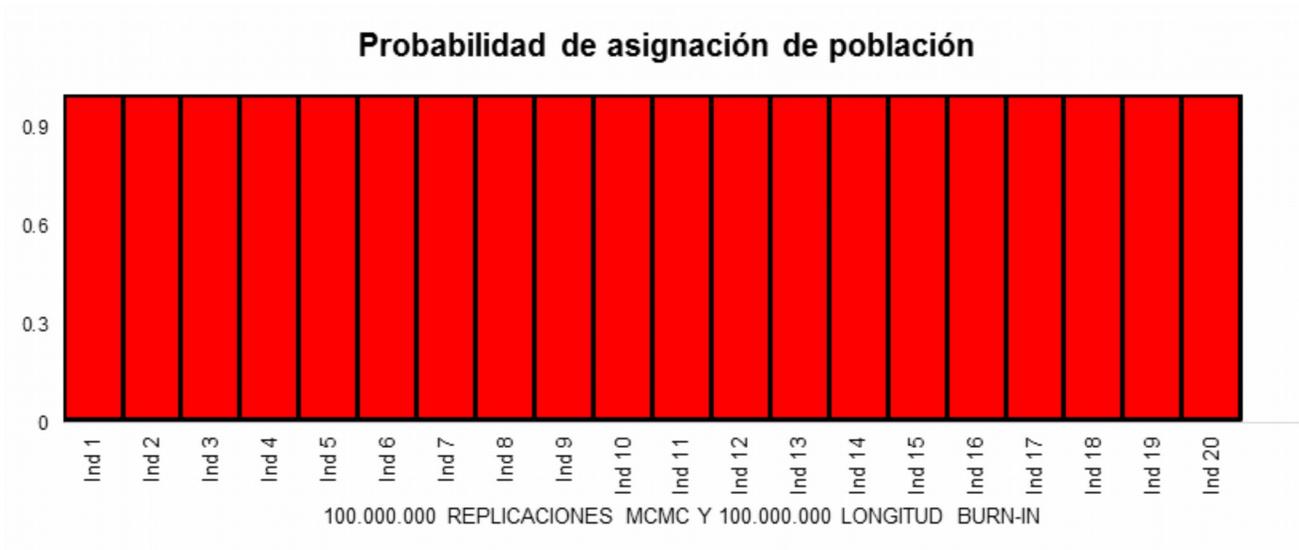


Figura 14: Análisis de inferencia Bayesiana con base con base en 4 loci MP-PCR de tres zonas del caribe colombiano.

5.3.3.2 Análisis de correspondencia múltiple

El análisis multifactorial determino la distribución de los individuos en cuatro poblaciones geográficas que se corresponden a los sitios de muestreo. El punto de partida es la localidad de San Jacinto en el departamento de Bolivar y Chinú en el departamento de Córdoba, a partir del cual se daría el flujo genético para las otras dos localidades, sin embargo se observó homogeneidad de los individuos que conforman los grupos.

Al igual que análisis anteriores esto muestra que el grupo formado se compone por un núcleo básico de individuos parta todos los sitios, producto de los migrantes presente en las cuatro localidades (Figura 15).

5.3.4. Aislamiento por distancia

Cuando una especie presenta una distribución geográfica amplia, generalmente se espera que las poblaciones más cercanas geográficamente también sean las más parecidas genéticamente, ya que se supone que el flujo génico debe ser más probable entre las poblaciones contiguas que entre las más lejanas. A esta idea se le conoce como “aislamiento por distancia” (Wright, 1978) y nos dice que los individuos tienden a aparearse más con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría si los cruzamientos fueran al azar en toda la distribución de la especie. Con el fin de conocer si la especie *C. gloeosporioides* sigue un modelo de aislamiento por distancia, es decir, si existe una correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas entre pares de poblaciones, se llevó a cabo un análisis estadístico formal como es la prueba de Mantel (1967) (Tabla 11): Si existe una correlación positiva significativa entre la distancia geográfica y la genética, existe evidencia de aislamiento por distancia, esto es, que el flujo génico es limitado y localizado, lo cual origina que las poblaciones más cercanas en el espacio sean más cercanas y tengan más flujo génico que las más alejadas.

La forma específica de graficar los datos en un análisis de aislamiento por distancia puede permitir hacer entender mejor los posibles modelos finos de estructura genética que siguen las poblaciones y hacer inferencias sobre la magnitud de sus tasa de migración (Rousset, 2001; Slatkin, 1994). En este caso la distancia genética usada fue directamente la distancia genética de Nei, como hizo Navarro-Quezada et al (2003).

En la figura 16 se ilustra el análisis usando 20 loci de MP-PCR para un conjunto de cuatro poblaciones de hongo *C. gloeosporioides* aislados de ñame en el Caribe Colombiano. Cada punto representa una comparación entre dos de las poblaciones. En esta figura se muestra las distancias genéticas de Nei (1972), correlacionada con la distancia geográfica (Anexo A y B).

Es claro que no existe correlación entre la distancia geográfica, y la distancia genética de Nei, ya que el valor p -calculado (0.603) es mayor que el nivel de significancia alfa (0.05) (Tabla 11) y como consecuencias el alto flujo genético entre las poblaciones estudiadas no está relacionado con la distancia geográfica. Sin embargo los resultados matemáticos revelan una relación entre la distancia genética y el número de migrantes; es decir que entre mayor es la distancia genética menor es el número de migrantes en una población (Nm). (Tabla 9). Estos resultados coinciden con Pinzón (2014) en su estudio de caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* en ñame, en el cual correlacionó las variables de caracterización con la ubicación geográfica, encontró que no existe un confinamiento de los aislamientos a un lugar geográfico o una relación con una determinada especie de ñame.

Igualmente la alta dispersión en los puntos, indica que hay poblaciones cercanas con poco flujo génico y otras más lejanas con niveles de flujo relativamente elevados, lo cual sugiere que la orografía y la ecología también son importantes en determinar los patrones de flujo y dispersión, no solo la distancia espacial. En términos generales, en estos agaves todas las poblaciones hasta 110km tienen un Nm mayor de 1, y como no hay poblaciones a mayor distancia, los modelos básicos de Wright indican que todas las poblaciones tienen suficiente flujo génico para no divergir entre ellas por deriva génica, permitiendo la acción efectiva de la selección natural al generar muy altos tamaños efectivos (Eguiarte, Aguirre, Scheinvar, González, & Souza, 2010; Eguiarte, 2009; Hedrick, 2005).

Tabla 11 Test de Mantel / Prueba bilateral: Distancias genéticas vs Distancias geográficas.

	Valor
r(AB)	-229
valor-p (bilateral)	0,603
alfa	0.05

Interpretación de la prueba:

Ho: Las matrices no están correladas.

Ha: Las matrices son correladas.

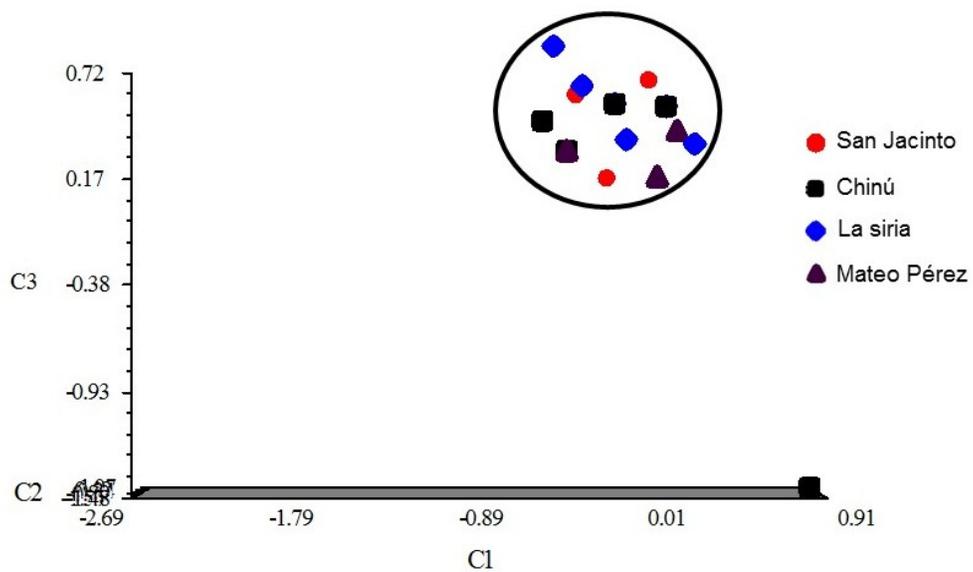


Figura 15: Análisis de Correspondencia múltiple para 20 individuos de *Colletotrichum gloeosporioides* basado en 4 cebadores tipo MP-PCR, en 3 poblaciones de la Costa Caribe Colombiana.F

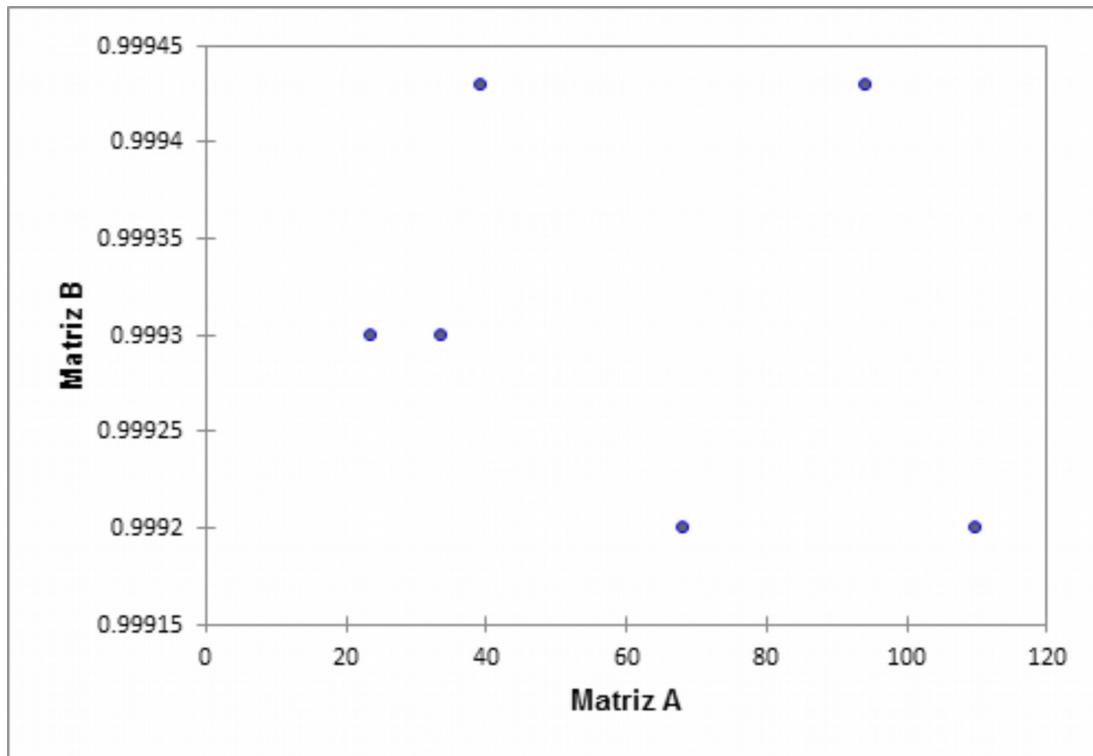


Figura 16: Correlación entre distancias genéticas de Nei y distancias geográficas mediante la prueba de Mantel

5.4. Estructura Genética Entre Las Poblaciones

Las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones constituyen la *estructura genética*. Cuando hablamos de una especie con *alta estructura genética*, nos referimos a que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. En contraste, en una especie con *baja estructura genética*, las poblaciones que la constituyen son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas. Entender las causas de la estructura genética, o sea las diferencias en las frecuencias alélicas, es fundamental para el futuro de dicha población (Sicard, Michalakis, Dron, & Neema, 1997).

La estructura genética de la población puede ser resultado de muchos factores, incluyendo el efecto del sistema reproductivo, el flujo génico, la historia ecológica entre otros, esto implica cambios en la distribución de los poblaciones e individuos, lo cual da como resultado el aislamiento geográfico o el alto flujo entre poblaciones (Sicard et al., 1997), para este estudio se determinó el nivel de variabilidad de *C. gloeosporioides* partiendo del porcentaje de loci polimórficos y del valor de la heterocigocidad, dentro y entre las poblaciones.

Con el fin de determinar la distribución de la variabilidad genética en las zonas muestreadas se realizó un análisis molecular de varianza jerárquico, análisis apropiado en el caso de marcadores dominantes como MP-PCR. El análisis permitió determinar que hay una baja diferenciación genética significativa entre las poblaciones estudiadas (sitios de muestreos). El porcentaje de varianza asociado a estructura entre poblaciones es del 1.471% mientras que existe una estructura genética fuerte en cuanto que hay diferencias en la distribución de la variabilidad genética dentro de la población. Es decir el porcentaje de loci polimórficos dentro de las poblaciones es de 98,52%, distribuidas, así: para la población de Mateo Pérez, un 6% para la población de la Siria un 7% para la población de Chinu un 10% y para la población de San Jacinto un 10% según los valores porcentuales de loci polimórficos se intuye que la población con mayor varianza a nivel genético entre sus individuos fueron las

poblaciones de Chinú y San Jacinto, seguido de la población de la Siria, indicando que las poblaciones con menor influencia de genes, son las de San Jacinto y Chinú, mostrando que el origen del flujo de genes está dado principalmente por estas dos poblaciones. Las diferencias no son muy grandes en magnitud, pero si suficientes como para determinar contraste en la composición genética de las poblaciones. A pesar de las diferencias en los loci se mantiene el flujo genético entre las poblaciones muestreadas de manera considerable (Tabla 12).

Tabla 12 *Análisis molecular de varianza jerárquico de 4 loci MP-PCR en 3 zonas agroecológicas de la Costa Caribe Colombiana. Valores de P basado en 9999 permutaciones. P-value. *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.0$.*

AMOVA					
Fuente	df	ss	ms	Est. Var.	%
Entre poblaciones	3	0,472	2,36	0,023	1,471529
Dentro poblaciones	19	4,445	1,64	1,54	98,52847
total	22	4,917		1,563	100
Stat	Value			P(rand \geq data)	
PhiPT	72			0,0965	

Al realizar la determinación de la estructura genética para las poblaciones muestreadas, con el fin de observar lo que estas presentan, se aprecia claramente que la población de Mateo Pérez presenta un valor de Heterocigocidad 0,66, seguido de la población de la Siria con un valor de Heterocigocidad 0,49, y las de menor heterocigocidad son las poblaciones de San Jacinto y Chinú con valor menor a 0,135, basados en los resultados obtenidos, las poblaciones presentan una estructura genética similar, en otras palabras tienen una baja estructura genética, indicando que los tamaños de las poblaciones han sido grandes, osea que ha habido muy poca deriva genética y/o que ha existido mucho flujo de genes (migración) entre estas poblaciones por mucho tiempo. independientemente de lo dicho cabe resaltar que a pesar que las poblaciones presentes estructuras similares, esto no indica que los fenotipos que conformen a las poblaciones sean los mismos (Tabla 13).

Tabla 13 *Parámetros de diversidad genética poblacional para cuatro loci MP-PCR en tres localidades de Costa Caribe Colombia. Na: No de alelos diferentes. Ne: No efectivo de alelos. uHe: heterocigocidad esperada sin desviación. He: heterocigocidad esperada.*

Datos de los loci Intra-poblacional						
Poblaciones	N	Na	Ne	He	uHe	%Loci polimórfico
M. Pérez	2	0,01	0,01	0,23	0,66	6,00%
Siria	8	0,05	0,005	0,13	0,49	7,00%
Chinu	6	0,002	0,022	0,87	0,127	10,00%
S. Jacinto	4	0,002	0,0003	0,98	0,134	10,00%

De igual manera los altos valores de Heterocigocidad en poblaciones como Mateo Pérez (0.66) y la Siria (0.49), señalan valores altos de diversidad dentro de estas poblaciones, y por lo tanto alta variabilidad genética entre sus individuos. Estos resultados sugieren que la población de *Colletotrichum gloeosporioides* en las zonas del presente estudio, representa y reúne fuertemente la diversidad genética de este patógeno. La alta heterocigocidad ha sido una característica que contribuyen a la diversidad genética y probablemente son factores importantes que han posibilitado la supervivencia de la *Colletotrichum gloeosporioides* a lo largo de muchos años en los cultivos de ñame del caribe colombiano (Spooner-Hart & Sergeeva, 2010).

Los resultados presentados concuerdan con las investigaciones de Álvarez *et al.* (2005), donde se reportan la aplicación de técnicas moleculares: Amplificación de la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADNr, análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción combinado con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLPs) y la amplificación aleatoria de microsatélites (RAMs) para la identificación de *C. gloeosporioides* en guanábana, las cuales les permitieron determinar un alto grado de variabilidad genética a un coeficiente de similitud de 0.31; igualmente Montero *et al.*, (1998), con el marcador molecular RAPDs en frutos de aguacate en Michoacán-México, determinaron la diversidad genética de este mismo hongo, mediante la aplicación de un índice de variabilidad genética basado en la proporción de la presencia/ausencia de las bandas amplificadas sobre el número total de bandas por iniciador y obtuvieron un valor de 0.41 para *C. gloeosporioides*,

concluyendo que dicha característica puede deberse a que el patógeno posee un ciclo de vida corto y reproducción de tipo sexual y asexual, confiriéndole una tasa alta de mutación y recombinación por cruzamiento. Más recientemente, Giraldo, Bustamante, Pinzón, Gutiérrez y Buitrago (2016), realizaron la caracterización molecular de aislados *Colletotrichum gloeosporioides* en plantas de ñame en el caribe colombiano incluyendo pruebas como “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)”. En los resultados encontraron un índice de diversidad genética de 0.28; datos que reflejan un alto grado de variabilidad en la colección estudiada de *C. gloeosporioides* y señalando que esto puede deberse, al intercambio de germoplasma, a su condición heterotálica, a las mutaciones y al alto potencial de dispersión de las conidias que le permiten mantener la viabilidad bajo condiciones adversas.

Esta alta diversidad ha sido explicada gracias a la evolución filogenética y las fuerzas evolutivas de selección, migración, mutación, hibridación, poliploidización e introgresión presente en este patógeno (Egúsquiza, 1987).

6. CONCLUSIONES

- El grupo de cebadores MP-PCR seleccionado permitió caracterizar genéticamente la población estudiada en términos de frecuencias alélicas, el polimorfismo y la riqueza alélica, lo cual llevo a establecer la diversidad genética y la estructura poblacional.
- Los marcadores morfológicos y moleculares permitieron corroborar la persistencia del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* como el agente causal de la antracnosis en los departamentos de Córdoba , Bolívar y Sucre.
- Los resultados encontrados mostraron que *Colletotrichum gloeosporioides* presenta una alta diversidad genética dentro de las poblaciones estudiadas, indicando mayor variación genética en las poblaciones de Mateo Pérez y la Siria en comparación con Chínú y San Jacinto, debida posiblemente al alto flujo genético en las poblaciones de estudio y a la diferenciación entre individuos dentro de las poblaciones.
- La estructura genética identificada a partir de marcadores moleculares MP-PCR permiten determinar que no existen diferencias entre los individuos de las cuatro localidades estudiadas, presentando una estructura genética similar, independientemente de lo dicho cabe resaltar que a pesar que las poblaciones presenten estructuras similares, esto no indica que los fenotipos que conformen a las poblaciones sean los mismos.
- Basados en el análisis de aislamiento por distancia, el alto flujo genético entre las poblaciones estudiadas no esta relacionado con la distancia geográfica , pero si con el numero de migrantes, es decir que entre mayor es la distancia genética menor es el numero de migrantes en una población. En consecuencia todas las poblaciones tienen suficiente flujo génico para no divergir entre ellas por deriva génica, permitiendo la acción efectiva de la selección natural.

- El flujo génico encontrado determina la persistencia y adaptación de poblaciones locales de *Colletotrichum gloeosporioides* en el Caribe Colombiano, ya que el flujo génico entre poblaciones de esta especie es alto, entonces todas las poblaciones evolucionan de manera conjunta.
- La variación genética presente en *C. gloeosporioides* refleja la capacidad del patógeno para evolucionar y adaptarse a diferentes ambientes, aspecto que contribuye al alto grado de dificultad en el diseño de estrategias de control efectivas y duraderas

7. RECOMENDACIONES

- Se sugiere ampliar el número de aislamientos y marcadores moleculares, con el fin de corroborar los resultados expuestos en este trabajo y resolver con mayor detalle las diferencias al interior de la colección.
- Es necesario continuar estudios relacionados con las relaciones filogenéticas, estudios taxonómicos, y de patogenicidad que complemente este estudio.

8. BIBLIOGRAFIAS

- Abang, M. M., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G. A., Mignouna, H. D., & Winter, S. (2006). Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. *Journal of Phytopathology*, *154*(1), 51–61.
- Abang, M. M., Fagbola, O., Smalla, K., & Winter, S. (2005). Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose disease of yam (*Dioscorea* spp.). *Journal of Phytopathology*, *153*(3), 137–142.
- Abang, M. M., Hoffmann, P., Winter, S., Green, K. R., & Wolf, G. A. (2004). Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *Journal of Phytopathology*, *152*(1), 21–27.
- Abang, M. M., Winter, S., Green, K. R., Hoffmann, P., Mignouna, H. D., & Wolf, G. A. (2002a). Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology*, *51*(1), 63–71.
- Abang, M. M., Winter, S., Green, K. R., Hoffmann, P., Mignouna, H. D., & Wolf, G. A. (2002b). Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology*, *51*(1), 63–71.
- Abang, Mathew M., Abraham, W.-R., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G., & Winter, S. (2009). Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycological Research*, *113*(1), 130–140.

- Abang, Mathew Musumbale. (2003). Genetic Diversity of *Colletotrichum-gloeosporioides* Penz. Causing Anthracnose Disease of-Yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *Mycotaxon*, 87. Retrieved from <http://www.schweizerbart.de/publications/detail/isbn/3443590993>
- 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(5), 579–587.
- Agrios, G. N. (2012). *Plant Pathology*. Elsevier.
- Alvarez, E., Mejía De Los Rios, J. F., Llano, G. A., & Loke, J. B. (2005). Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose in soursop (*Annona muricata*) in Valle del Cauca, Colombia. Retrieved from http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/poster_soursop_high_value_crops_2005.pdf
- Amusa, N. A., Adegbite, A. A., & Oladapo, M. O. (2005). Fungal Diseases of Yam in Western Nigeria. *International Journal of Botany*, 1(2), 111–115.
- Aranza, Y. C. R. (2012). *El cultivo de ñame en el Caribe Colombiano*. Banco de la Republica de Colombia. Retrieved from <https://ideas.repec.org/p/bdr/region/168.html>
- Assigbetse, K. B., Fernandez, D., Dubois, M.-P., Geiger, J.-P., & others. (1994). Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology*, 84(6), 622–626.
- Barcelos, Q. L., Souza, E. A., & Damasceno e Silva, K. J. (2011). Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 230–242.
- Boeger, J. M., Chen, R. S., & McDonald, B. A. (1993). Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. *Phytopathology*, 83(11), 1148–1154.

- Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S., Timmer, L. W., & others. (1996). Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*, 86(5), 523–527.
- Bustamante, S. L., Guzmán, M., & Buitrago, G. (2003). Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)” en condiciones radiactivas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 57–63.
- Cannon, P. F. (2000). Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. *Colletotrichum. Host Specificity, Pathology, and Host-pathogen Interaction*, 1–20.
- Cannon, Paul F., Buddie, A. G., Bridge, P. D., & others. (2008). The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon*, 104, 189–204.
- Cano, J., Guarro, J., & Gené, J. (2004). Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2450–2454.
- Cerón Rincón, L. E., HIGUERA, B. L., SÁNCHEZ, J., Bustamante, S., & Buitrago, G. (2006). Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* durante su cultivo en medios líquidos. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1). Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/3190/319028578008/>
- Corda, A. C. (1831). Die Pilze Deutschlands. *Deutschlands Flora in Abbildungen Nach Der Natur Mit Beschreibungen*, 3, 1–144.
- Correa Londoño, G., Lavalett Oñate, L. L., Galindo Villardón, M. P., & Afanador Kafuri, L. (2007). USE OF MULTIVARIATE METHODS FOR GROUPING STRAINS OF *Colletotrichum* spp. BASED ON CULTURAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERS. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 60(1), 3671–3690.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Richardson, D. M., Le Roux, J. J., Strasberg, D., Edwards, J., ... others. (2016). Fungal Planet description sheets: 400–468. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36, 316.

- Damm, U., Woudenberg, J. H. C., Cannon, P. F., Crous, P. W., & others. (2009). Colletotrichum species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity*, 39, 45.
- Diéguez-Uribeondo, J., Förster, H., Soto-Estrada, A., & Adaskaveg, J. E. (2005). Subcuticular-Intracellular Hemibiotrophic and Intercellular Necrotrophic Development of *Colletotrichum acutatum* on Almond. *Phytopathology*, 95(7), 751–758.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0751>
- Durand, N., Bertrand, B., Guyot, B., Guiraud, J.-P., Tachon, A. F., & others. (2009). Study on the *Coffea arabica*/*Colletotrichum kahawae* pathosystem: Impact of a biological plant protection product. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116(2), 78.
- Eguiarte, L. (2009). Nueva guía para principiantes en genética de poblaciones. *Evolución Biológica. Una Visión Actualizada de La Revista Ciencias*, Morrone, JJ, Magaña, P., (eds.). *Facultad de Ciencias, UNAM. México*, 83–102.
- Eguiarte, L., Aguirre, E., Scheinvar, E., González, A., & Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. *Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México*. Retrieved from <http://www.ecotips.com.mx/Bioconservacion/EguarteFlujogenetico.pdf>
- Egúsqiza, R. (1987). Botánica, Taxonomía y Mejoramiento genético de papa. *El Cultivo de Papa Con Énfasis En La Producción de Semilla. Universidad Nacional Agraria. La Molina Perú*, 11–36.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.

- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Resources*, 7(4), 574–578.
- FAOSTAT. (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved September 23, 2017, from http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/NAME.HT
- FAOSTAT. (2014). Retrieved June 25, 2017, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Franco, J., Crossa, J., Warburton, M. L., & Taba, S. (2006). Sampling strategies for conserving maize diversity when forming core subsets using genetic markers. Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/46/2/854>
- Freeman, S., & Katan, T. (1997). Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology*, 87(5), 516–521.
- Freeman, S., & Rodriguez, R. J. (1995). Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. *Mycological Research*, 99(4), 501–504.
- Freeman, Stanley, Katan, T., & Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82(6), 596–605.
- Freeman, Stanley, Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., & Shabi, E. (2000). Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*, 90(6), 608–614.
- Freeman, Stanley, Minz, D., Maymon, M., & Zveibil, A. (2001). Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. *Phytopathology*, 91(6), 586–592.
- Garcia, A. (1988). *Patología vegetal práctica*. Limusa.

- García-Mas, J., Oliver, M., Gómez-Paniagua, H., & De Vicente, M. C. (2000). Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 101(5), 860–864.
- Giraldo Marroquín, N., Bustamante Rodríguez, S. L., Pinzón Gutiérrez, Y. A., & Buitrago Hurtado, G. (2016). Molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from yam plants of Colombia Atlantic Coast using DNA Amplification Fingerprinting technique (DAF). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 95–103.
- González Vega, M. E. (2012). El Ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 05–15.
- Gunnell, P. S., & Gubler, W. D. (1992). Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, 157–165.
- Hadden, J. F., & Black, L. L. (1989). Anthracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp. In *Proceeding of the International Symposium on Integrated Management Practices: Tomato and Pepper Production in the Tropics. Asian Vegetable Research and Development Centre, Taiwan* (pp. 189–199). Retrieved from http://203.64.245.61/fulltext_pdf/eam0220.pdf
- Hearne, C. M., Ghosh, S., & Todd, J. A. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*, 8(8), 288–294.
- Hedrick, P. W. (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59(8), 1633–1638.
- Hwang, C.-S., Flaishman, M. A., & Kolattukudy, P. E. (1995). Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *The Plant Cell Online*, 7(2), 183–193.
- Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., & Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, 39(2), 1–17.

- Karp, A., Ingram, D. S., & Isaac, P. G. (2012). *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. Springer Science & Business Media. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LijyCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR15&dq=Molecular+tools+for+screening+biodiversity:+plants+and+animals.&ots=1s7laGBFEe&sig=3MFNjgJYT-tr_qg9Ky5VtQn8JFM
- Kraic, J., Žáková, M., & Gregova, E. (1998). Comparison of differentiation capability of RAPD and SSR markers in commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Cereal Research Communications*, 375–382.
- Kumar, A. B., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2011). Cross-species amplification of microsatellite loci in three mangrove species of India. *Int. J. Adv. Biotech. Res*, 2, 240–243.
- Lazar, I., & Lazar, I. (2010). GelAnalyzer. *Freeware 1D Gel Electrophoresis Image Analysis Software: Http://www. Gelanalyzer. Com*.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Yu3cBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&dq=The+Laboratory+Fusarium+Manual.&ots=3K_89LOIYp&sig=2Fj04ApsJYUwmVLx5JJVvy3aHIQ
- Liyanage, H. D., McMillan, R. T., & Kistler, H. C. (1992). Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*, 82(11), 1371–1376.
- López, A. J., & Gamero, G. (1998). Comportamiento de clones de ñame tolerantes a antracnosis (*Collectotrichum gloeosporioides*) en tres sistemas de cultivo en la región Caribe : informe final del proyecto financiado con recursos de la primera convocatoria del PRONATTA. Cereté (Colombia)-CORPOICA.

- Lu, G., Cannon, P. F., Reid, A., & Simmons, C. M. (2004). Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological Research*, *108*(1), 53–63.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, *27*(2 Part 1), 209–220.
- Martínez-Culebras, P. V., Barrio, E., García, M. D., & Querol, A. (2000). Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. *FEMS Microbiology Letters*, *189*(1), 97–101.
- McDonald, B. A., & McDermott, J. M. (1993). Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*, *43*(5), 311–319.
- Mignouna, H. D., Abang, M. M., & Asiedu, R. (2007). Yams. *Pulses, Sugar and Tuber Crops*, 271–296.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S., & Brown, A. E. (1992). Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, *98*(1-3), 137–143.
- Minagricultura. (2009). Exportadores de ñame de la mano del ICA. Retrieved September 23, 2017, from <http://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Noticia241.aspx>
- Ministerio de Agricultura. (2015). “ÑAME” Evaluaciones agropecuarias municipales. Ministerio de Agricultura Colombiano. Retrieved from <http://www.agronet.gov.co/Documents/%C3%91ame.pdf#search=produccion%20de%20%C3%B1ame>.
- Montaldo, A. (1991). *Cultivo de raíces y tubérculos tropicales*. Agroamerica. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=XCBSQplbTNwC&oi=fnd&pg=PR5&dq=montaldo+1991&ots=0_s-DsviT9&sig=n1JdlOoRRpttDagF-2DAZg_2l9w

- Montero Tavera, V., Morales García, J. L., González Chavira, M. M., López, A., Luis, J., Corona Torres, T., & Gálvez Mariscal, A. (2010). Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(2), 159–174.
- Mordue, J. E. M. (1971). *Glomerella cingulata*. CMI Description of pathogenic Fungi and Bacteria No. 315. *Commonwealth Mycological Institute, Surrey, UK*.
- Morgante, M., & Olivieri, A. M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3(1), 175–182.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N., & Deising, H. B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.008>
- Muniz, M. de F., De Mello, M., Queiroz, F., Menezes, M., & Castro, N. (1997). *Colletotrichum gloeosporioides* como patógeno da mangabeira (*Hancornia speciosa*) no Brasil. *Summa Phytopatologica*, 31, 42–43.
- Navarro-Quezada, A., González-Chauvet, R., Molina-Freaner, F., & Eguiarte, L. E. (2003). Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity*, 90(3), 220.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283–292.
- Nguyen, P. T. H., Pettersson, O. V., Olsson, P., & Liljeroth, E. (2010). Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. *European Journal of Plant Pathology*, 127(1), 73–87.
- Nguyen, T. H. P., Säll, T., Bryngelsson, T., & Liljeroth, E. (2009). Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. *Plant Pathology*, 58(5), 898–909.

- Oliveira, V. A., Martins, L. P., Cavalcante, R. G., Benício, L. P. F., Da Costa, D. L., & Ludwig, J. (2013). Use of seed treatment with fungicide in control of *Colletotrichum truncatum* and physiological quality of soybean seeds *Glycine max*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, *4*(2). Retrieved from <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/JBB/article/view/261>
- Osorio, J., & Ramírez, B. (1989). Principales enfermedades de ñame en la región Caribe colombiana. *ICA Informa*, *23*(1), 13–19.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2001). GenAIEx V5: genetic analysis in Excel. *Population Genetic Software for Teaching and Research*. Australian National University, Canberra, Australia.
- Pérez, J., Albert, D., Rosete, S., Sotolongo, L., Fernández, M., Delprete, P., & Raz, L. (2005). Consideraciones etnobotánicas sobre el género *Dioscorea* (Dioscoreaceae) en Cuba. *Revista Ecosistemas*, *14*(2). Retrieved from <https://revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/421>
- Pinzón, Y. (2014). Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica. *Bogotá DC Universidad Nacional de Colombia*.
- PONCE CLAVIJO, N., & MARTINEZ, E. (2012). *EXPERIENCIAS Y ENFOQUES DE PROCESOS PARTICIPATIVOS DE INNOVACIÓN EN AGRICULTURA*. FAO-FIAT*-PANIS.
- Ripoche, A., Jacqua, G., Bussièrre, F., Guyader, S., & Sierra, J. (2008). Survival of *Colletotrichum gloeosporioides* (causal agent of yam anthracnose) on yam residues decomposing in soil. *Applied Soil Ecology*, *38*(3), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.10.015>

- Rodríguez, A., & Gaitán, A. (2007). Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. *Centro de Investigaciones de Café, CENICAFÉ*, 1–13.
- Rodríguez, W. (2000). Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*, 11(2). Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/437/43711221/>
- Rohlf, F. J. (1992). *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Applied Biostatistics.
- Rousset, F. (2001). Inferences from spatial population genetics. *Handbook of Statistical Genetics*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470022620.bbc24/full>
- S.L, B. (2013). Cultivo del Ñame. Retrieved September 23, 2017, from http://www.botanical-online.com/dioscorea_alata_cultivo.htm
- Samarakoon, T., Wang, S. Y., & Alford, M. H. (2013). Enhancing PCR amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive. *Applications in Plant Sciences*, 1(1).
- Sambrook, J. R., & Russell, D. (2001). DW. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual. *Quarterly Review of Biology*, 76(3), 348–349.
- Sanabria, A., Mahuku, G., Kelemu, S., Cadavid, M., García, C., Hío, J. C., ... Osorio, J. A. (2010). Molecular identification and characterization of *Colletotrichum* spp isolates from tahiti lime, tamarillo, and mango. *Agronomía Colombiana*, 28(3), 383–391.
- Sánchez, C., & Hernández, L. (1998). descripción de aspectos productivos, de postcosecha y de comercialización del ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar. *Corpoica-CI Turipaná, Cereté*.
- Sarmiento-Rondón, M., Pérez, F., González, A., & Negrón, E. (2010). Empaque de Ñame (*Dioscorea rotundata*) bajo condiciones de atmósfera modificada.

- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, *9*(5), 615–629.
- Shen, S., Goodwin, P., & Hsiang, T. (2001). Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum*, causing anthracnose of tobacco. *Mycological Research*, *105*(11), 1340–1347. <https://doi.org/10.1017/S0953756201005111>
- Sicard, D., Michalakakis, Y., Dron, M., & Neema, C. (1997). Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, *87*(8), 807–813.
- Simmonds, J. H., & others. (1966). A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, *22*(4), 437–459.
- Slatkin, M. (1994). Linkage disequilibrium in growing and stable populations. *Genetics*, *137*(1), 331–336.
- Smith, B. J., Black, L. L., & others. (1990). Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*, *74*(1), 69–76.
- Spooner-Hart, R., & Sergeeva, V. (2010). *Anthracnose rears its ugly head this season*. The Olive Press.
- Sreenivasaprasad, S., & Talhahas, P. (2005). Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology*, *6*(4), 361–378.
- Stephenson, S.-A., Hatfield, J., Rusu, A. G., Maclean, D. J., & Manners, J. M. (2000). CgDN3: An Essential Pathogenicity Gene of *Colletotrichum gloeosporioides* Necessary to Avert a Hypersensitive-Like Response in the Host *Stylosanthes guianensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *13*(9), 929–941. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.9.929>
- Sutton, B. C. (1980). *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stomata*. Commonwealth Mycological Institute Kew, England. Retrieved from

<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?>

IsisScript=FOCAD.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=003898

- Sutton, T. B. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, Ed. Bailey-Jeger CAB.
- Sutton, Turner B., & Sanhueza, R. M. (1998). Necrotic leaf blotch of Golden delicious—*Glomerella* leaf spot: a resolution of common names. *Plant Disease*, 82(3), 267–268.
- Tafur, R., Toro, J., Perfetti, J., Ruiz, D., & Morales, J. (2006). Plan frutícola nacional (PFN). *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola, Asohofrucol, SAG*, 43.
- Than, P. P., Jeewon, R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., & Taylor, P. W. J. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*, 57(3), 562–572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01782.x>
- Tode, H. J. (1790). *Fungi Mecklenbergensis Selecti*, 1, 1–64.
- Van der Aa, H. A., Noordeloos, M. E., Gruyter, J. de, & others. (1990). Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Studies in Mycology*, (32), 3–19.
- Vinnere, O., Fatehi, J., Wright, S. A., & Gerhardson, B. (2002). The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia. *Mycological Research*, 106(1), 60–69.
- Von Arx, J. A. (1957). Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathol Z*, 29, 413–468.
- Warburton, M. L., Xianchun, X., Crossa, J., Franco, J., Melchinger, A. E., Frisch, M., ... Hoisington, D. (2002). Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. *Crop Science*, 42(6), 1832–1840.
- Weeds, P. L., Chakraborty, S., Fernandes, C. D., d' A. Charchar, M. J., Ramesh, C. R., Kexian, Y., & Kelemu, S. (2003). Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides*

from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. *Phytopathology*, 93(2), 176–185.

Weising, K., Atkinson, R. G., & Gardner, R. C. (1995). Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *Genome Research*, 4(5), 249–255.

Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. CRC press. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=a2wO3omyFkwC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Weising+et+al.,+2005&ots=VN1KL1zGvA&sig=8pE7CkJw5wHRpweZfl3_-DDfGn8

Wharton, P. S., & Diéguez Uribeondo, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 61(1). Retrieved from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=55661101>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. L., & others. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315–322.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535.

Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations, vol. 4. Variability within and among populations*. University of Chicago Press, Chicago.

Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T. B., Ye, Z. H., & Mao, J. X. (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada*, 10, 295–301.

ANEXOS

Anexo A: Distancia geográficas entre los sitios de muestreos en kilómetros.

	M. Perez	La Siria	Chinú	S. Jacinto
M. Perez	0	32,2	23,7	94,1
La Siria	35,3	0	23,7	68
Chinú	23,7	55	0	110
S. Jacinto	94,1	68	110	0

Anexo B: Distancia genética entre los sitios de muestreos por el coeficiente de Nei Li (1972).

	M. Perez	La Siria	Chinú	S. Jacinto
M. Perez	0	0,9993	0,9993	0,99943
La Siria	0,9993	0	0,99943	0,9992
Chinú	0,9993	0,99943	0	0,9992
S. Jacinto	0,99943	0,9992	0,9992	0

Anexo C: Variables morfológicas empleadas para la caracterización de *C. gloeosporioides*.

TIPO DE MUESTRA	GÉNERO	COLONIA		MICELIO			CONIDIA			ESPORULACION
		Color	Color	Aspecto	Tipo de crecimiento	Tasa de Crecimiento (cm/día)	Forma	MEDIDAS (Largo- Ancho) (µm)	COLOR	Conidios/mL
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Gris palido	Gris verdoso	Algodonoso	Concentrico	12	Cilindro - ovoide	10 - 2,5	hialina	122500
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Gris palido	Blanco	Algodonoso	Concentrico	15,6	Cilindro - ovoide	8 - 2,5	hialina	384000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Gris palido	Blanco	Algodonoso	Concentrico	13,8	Cilindro - ovoide	10 - 2,5	hialina	60000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	5Y 6/4 pale olive	Blanco	Algodonoso	Concentrico	19,8	Cilindro - ovoide	10 - 2,75	hialina	325000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Amarillo claro	Blanco	Algodonoso	Concentrico	16,2	Cilindro - ovoide	14 - 2,5	hialina	265500
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Amarillo claro	Blanco	Semi algodonoso	Concentrico	11,4	Cilindro - ovoide	10,3 - 2,5	hialina	285500
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Amarillo	Blanco	Algodonoso	Concentrico	11,86	Cilindro - ovoide	10 - 2,5	hialina	215000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Gris claro	Blanco	Algodonoso	irregular	12,6	Cilindro - ovoide	13,5 - 2,5	hialina	33750
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Gris claro	Blanco	Algodonoso	Concentrico	16,2	Cilindro - ovoide	10 - 2,5	hialina	55000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Oliva	Blanco	Algodonoso	Concentrico	14,1	Cilindro - ovoide	10.4 -2.5	hialina	123750
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Rosa	Blanco	Esponjoso	Plano	13,52	Cilindro - ovoide	9.8-2.5	hialina	40000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Amarillo pálido	Blanco	Algodonoso	Levantado	10,86	Cilindro - ovoide	9.32-2.5	hialina	128600
Hoja	<i>C. cf. dematium</i>	Gris claro	Blanco	Semi algodonoso	Concentrico	10,2	Falcada con vacuola	14,5 - 2,5	hialina	68000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Gris verdoso muy oscuro	Gris oscuro	Esponjoso	Levantado	13,68	Cilindro - ovoide	11.13-2.5	hialina	126000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Amarillo palido	Blanco	Esponjoso	Plano	13,08	Cilindro - ovoide	11.25-2.5	hialina	356000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Amarillo palido	Blanco	Esponjoso	Saliente	12,87	Cilindro - ovoide	10.83-2.5	hialina	356700
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Gris verdoso claro	Gris claro	Esponjoso	Saliente	13,95	Cilindro - ovoide	10.9-2.5	hialina	224375
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	rosa	Gris claro	Algodonoso	Levantado	13,73	Cilindro - ovoide	9.62-2.74	hialina	123500
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Marron amarillo claro	Gris claro	Esponjoso	Levantado	13,63	Cilindro - ovoide	11.61-2.5	hialina	267000
Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>	Gris verdoso	Blanco	Algodonoso	Concentrico	13,2	Cilindro - ovoide	10 - 2,5	hialina	45000