

DISTRIBUCIÓN VERTICAL Y TEMPORAL DE *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) SOBRE UNA SIEMBRA COMERCIAL DE GANDUL (*Cajanus cajan* L.)

por

Idarnis Gaztambide Alameda

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
en
BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2005

Aprobado por:

Lydia I. Rivera Vargas, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Rafael R. Montalvo Rodríguez, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Sandra L. Maldonado Ramírez, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Angel Bosques Vega M.S.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Lucy Bunkley-Williams, Ph.D.
Directora del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], a crop of great importance in tropical countries, is affected by pod anthracnose, caused by *Colletotrichum* spp. The objectives of this investigation were to study the vertical and temporal distribution and incidence of *Colletotrichum* spp. on a pigeon pea field. A sampling tower was designed to accommodate Petri plates with oatmeal agar and exposed them for ten minutes. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium* and *Penicillium* prevailed in all samplings. All *Colletotrichum gloeosporioides* colonies were recuperated during the morning hours, at 94, 180, 190 cm from the ground, with a frequency of 0.009. All *C. gloeosporioides* isolates examined were pathogenic to pods and presented by PCR amplification, a band of 600 pb molecular weight, approximately. RFLP analysis presented three band pattern for all isolates. Sequencing analysis of DNA showed that isolates belong to *G.cingulata*.

RESUMEN

El gandul [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] es un cultivo de gran importancia en países tropicales, que es afectado por la antracnosis de la vaina causada por *Colletotrichum* spp. Esta investigación tuvo como propósito estudiar la distribución vertical y temporal e incidencia de *Colletotrichum* spp. sobre una siembra comercial. Se colocaron platos Petri con agar de avena en una torre y se expusieron durante diez minutos. *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium* y *Penicillium*, prevalecieron en todos los muestreos. Las colonias de *Colletotrichum gloeosporioides* fueron recuperadas en la mañana, a 94, 180, 190 cm del suelo, con una frecuencia de 0.009. Todos los aislados de *C. gloeosporioides* estudiados presentaron, mediante PCR, una banda de un peso molecular de aproximadamente 600 pb. El análisis de RFLP mostró un patrón de tres bandas para todos los aislados. Un análisis de secuenciación del ADN determinó que los aislados pertenecen a *G.cingulata*.

Derechos de Autor Reservados, Idarnis Gaztambide Alameda, 2005

A mi familia . . .

AGRADECIMIENTOS

Realizar mi maestría ha sido una de las experiencias más gratificantes de mi vida, pero no hubiera podido ser así sin la ayuda de ciertas personas durante el proceso. Dedico esta sección a todas las personas que brindaron su apoyo incondicional, en reconocimiento de su gran aporte.

Quiero agradecer a Dios por ponerme en el camino a todas estas personas que contribuyeron de alguna manera en la realización de mis estudios de maestría.

Quiero agradecer sinceramente a la consejera de mi tesis, la Dra. Sandra Maldonado por haber confiado en mi capacidad, por haberme ayudado con el trabajo de campo, por sus ideas, sus sugerencias en las correcciones de mi tesis y su apoyo. También, quiero reconocer la ayuda de su esposo Hernán Torres, por la creación, en conjunto con la Dra. Maldonado, del muestreador utilizado para los muestreos de campo y a sus hijos Carmen y Hernán por todos los juegos y momentos de despeje.

Además, deseo destacar la labor de los miembros de mi comité graduado. Al Dr. Rafael Montalvo, por sus ideas, ayuda en la parte molecular y asistencia en las correcciones de este documento. A la Dra. Lydia Rivera, por haber sido una gran inspiración como profesora y por las correcciones de mi tesis.

Al Dr. Carlos Betancourt, por motivarme en el estudio de la micología, por sus consejos y sugerencias.

Quiero reconocer especialmente a mi madre, Myrna Alameda, por su amor incondicional, por sus consejos e ideas, por todo el tiempo que dedicó a ayudarme con mi trabajo, por su ayuda en la redacción y correcciones de mi tesis.

A mis amistades por su apoyo. En especial quiero agradecer a la estudiante subgraduada, Laura Rodríguez, por su amistad y por su gran ayuda en el laboratorio. A la estudiante graduada, Gretchen Díaz por su amistad y su colaboración en la parte molecular de esta investigación. A Mariela González, por su ayuda en la identificación de hongos, consejos y su amistad.

Mi agradecimiento a Miguel Arango, estudiante graduado del Departamento de Agronomía y Suelos, por su asistencia con los análisis estadísticos. Al Sr. José Almodóvar, del Centro de Microscopía, del Departamento de Biología, Recinto Universitario de Mayagüez (UPR), por la ayuda en la preparación de las muestras y por la toma de fotos utilizando el microscopio electrónico de rastreo. Agradezco sus sugerencias para la organización y el arreglo de fotos, y por todo el tiempo que dedicó sin tener que hacerlo.

A la Sra. Carolyn Rivera, técnica del laboratorio de Micología, por su colaboración en la identificación de los hongos y por su ayuda en otros aspectos relacionados a mi maestría.

También, quiero agradecer la ayuda brindada por el investigador Ángel Bosques, de la Estación Experimental Agrícola de Isabela (EEA de Isabela), por

el tiempo que dedicó para instruirme sobre el gandul y por permitirme trabajar con sus siembras.

A Alexis Postigo, por su gran asistencia durante todos los muestreos.

Quisiera reconocer la ayuda del Departamento de Biología del RUM-UPR, de la Universidad de Puerto Rico por permitirme utilizar sus facilidades de laboratorio, y especialmente al laboratorio de Biología Molecular de la Finca Alzamora, del Departamento de Agronomía y Suelos, donde se llevó a cabo la mayor parte de mi investigación.

Finalmente y no menos importante a mi familia, a quienes dedico mi trabajo, por haberme enseñado a ser mejor cada día.

Tabla de Contenido

ABSTRACT	II
RESUMEN	III
AGRADECIMIENTOS.....	VI
TABLA DE CONTENIDO	IX
LISTA DE TABLAS	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	9
2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL GÉNERO <i>COLLETOTRICHUM</i>	9
2.2 AEROBIOLOGÍA DE <i>COLLETOTRICHUM</i>	16
2.3 ASPECTOS DE LA AEROBIOLOGÍA DE HONGOS	17
3 MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 ESTUDIO PRELIMINAR EN SIEMBRA DE GANDUL	21
3.2 MUESTREO DE SIEMBRA DE GANDUL	22
3.3 PREPARACIÓN DE LAMINILLAS CON SUPERFICIE ADHESIVA	22
3.4 EXPOSICIÓN DE PLATOS PETRI Y LAMINILLAS CON SUPERFICIE ADHESIVA	24
3.5 EVALUACIÓN DEL TEJIDO VEGETAL	28
3.6 EVALUACIÓN DE LA PUPAS DE LA MOSCA <i>MELANAGROMYZA OBTUSA</i>	32
3.7 PREPARACIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.....	33
3.8 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE CULTIVOS DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.	33
3.9 PREPARACIÓN DE CÁMARAS HÚMEDAS PARA LA FORMACIÓN DE APRESORIOS Y ESPORAS DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.	35

3.10	PREPARACIÓN DE VAINAS DE GANDUL PARA SER OBSERVADOS POR UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE RASTREO	35
3.11	EXTRACCIÓN DEL ADN RIBOSOMAL DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.	37
3.12	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DE AISLADOS DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.....	39
3.13	POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.	40
3.14	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	41
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1	ESTUDIO PRELIMINAR EN SIEMBRA DE GANDUL	42
4.2	EXPOSICIÓN DE PLATOS PETRI.....	42
4.2.1	<i>Características morfológicas del Morfotipo 1</i>	55
4.2.2	<i>Efecto de la altura de exposición de platos, períodos de exposición, cada muestreo y la cantidad de aislados de cada especie sobre los hongos aislados (totales o más frecuentes)</i>	58
4.2.3	<i>Correlación entre el total de hongos aislados y el tipo de nube sobre la siembra de gandul</i>	60
4.3	AEROBIOLOGÍA DE <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i>	60
4.4	EXPOSICIÓN DE LAMINILLAS CON SUPERFICIE ADHESIVA.....	61
4.5	EVALUACIÓN DEL TEJIDO VEGETAL Y DE LAS PUPAS DE LA MOSCA <i>MELANAGROMYZA</i> <i>OBTUSA</i>	62
4.6	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE CULTIVOS DE <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i>	64
4.7	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS DE LOS AISLADOS EN AA ...	68
4.8	PREPARACIÓN DE CÁMARAS HÚMEDAS PARA LA FORMACIÓN DE APRESORIOS Y ESPORAS DE <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> <i>IN VITRO</i>	69
4.9	MICROGRAFÍAS DE ESPORAS Y APRESORIOS DE <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> OBSERVADAS A TRAVÉS DE UN MER	71
4.10	EXTRACCIÓN DEL ADN DE <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i>	78
4.11	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DE AISLADOS DE <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i>	78

4.12	POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.	80
4.13	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	80
5	CONCLUSIONES	82
6	RECOMENDACIONES	84
	REFERENCIAS	85
	APÉNDICE	94
	APÉNDICE A. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	95

Lista de Tablas

Tablas	Página
TABLA 1. FRECUENCIA DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> EN EL AIRE DE UNA SIEMBRA COMERCIAL DE GANDUL, EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGRÍCOLA DE ISABELA, DURANTE EL MUESTREO PRELIMINAR REALIZADO EL 6 DE DICIEMBRE DE 2003.	43
TABLA 2. GÉNEROS DE HONGOS MICELIALES AISLADOS Y SU FRECUENCIA EN EL AIRE SOBRE LA SIEMBRA DE GANDUL COMERCIAL, CULTIVAR I-8-3-1, DURANTE LOS CUATRO MUESTREOS REALIZADOS.	44
TABLA 3. GÉNEROS DE HONGOS MICELIALES AISLADOS Y SU FRECUENCIA EN EL AIRE SOBRE LA SIEMBRA DE GANDUL COMERCIAL, CULTIVAR I-8-3-1, DURANTE CADA MUESTREO REALIZADO.	48
TABLA 4. PORCENTAJE DE SEVERIDAD DEL DAÑO CAUSADO POR <i>C. GLOESPORIOIDES</i> EN LA VAINA DE GANDUL A LOS CINCO Y SIETE DÍAS DESPUÉS DE INOCULADAS.	65

Lista de Figuras

Figuras	Página
FIGURA 1. (A) VISTA GENERAL Y (B) PLANTA CON FLORES Y VAINAS MADURAS EN DETALLE, DE LA SIEMBRA DE GANDUL COMERCIAL MUESTREADA, LOCALIZADA EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGRÍCOLA DE ISABELA, PR.	23
FIGURA 2. (A) ATRAPADOR DE ESPORAS CONTENIENDO LOS PLATOS PETRI, LOCALIZADO EN MEDIO DE LA SIEMBRA DE GANDUL COMERCIAL, (B) MONITOR KESTREL 4000 PARA MEDIR LAS CONDICIONES AMBIENTALES AL MOMENTO DEL MUESTREO, (C) ACERCAMIENTO DEL MUESTREADOR CONTENIENDO LOS PLATOS PETRI.....	26
FIGURA 3. (A) HOJAS DE GANDUL Y (B) DE YERBA GUINEA (<i>UROCHLOA MAXIMA</i>) (INDICADO POR LAS FLECHAS) CON LESIONES, ENTRE LA SIEMBRA DE GANDUL, ANALIZADOS PARA DETERMINAR SU RELACIÓN CON LA DISPERSIÓN Y FUENTE DE INÓCULO DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.	29
FIGURA 4. FLORES Y CAPULLOS DE GANDUL ANALIZADOS PARA DETERMINAR SU RELACIÓN CON LA DISPERSIÓN Y FUENTE DE INÓCULO DE <i>COLLETOTRICHUM</i>	31
FIGURA 5. HONGOS MICELIALES MÁS FRECUENTES RECUPERADOS DURANTE EL PRIMER MUESTREO, (A) <i>CURVULARIA</i> SPP., (B) <i>FUSARIUM</i> SPP., (C) <i>DRECHSLERA</i> SPP., (D) <i>PENICILLIUM</i> SPP., (E) <i>ALTERNARIA</i> SPP. Y (F) <i>RHIZOPUS</i> SP.....	50
FIGURA 6. HONGOS MICELIALES MÁS FRECUENTES RECUPERADOS DURANTE EL SEGUNDO MUESTREO, (A) <i>FUSARIUM</i> SPP, (B) <i>CURVULARIA</i> SPP, (C) <i>TRICHODERMA</i> SPP., (D) <i>ASPERGILLUS</i> SPP., (E) <i>MUCOR</i> SPP. Y (F) COLUMELA DE <i>MUCOR</i> ; (A) COLLARETE.....	51
FIGURA 7. HONGOS MICELIALES MÁS FRECUENTES RECUPERADOS DURANTE EL TERCER MUESTREO, (A) <i>ALTERNARIA</i> SPP., (B) <i>ASPERGILLUS</i> SPP., (C) <i>CURVULARIA</i> SPP., (D) <i>FUSARIUM</i> SPP. (E) <i>NIGROSPORA</i> SPP. Y (F) <i>DRECHSLERA</i> SPP.	52
FIGURA 8. HONGOS MICELIALES MÁS FRECUENTES RECUPERADOS DURANTE EL CUARTO MUESTREO, (A) <i>CURVULARIA</i> SPP., (B) <i>FUSARIUM</i> SPP., (C) <i>ALTERNARIA</i> SPP., (D) <i>CLADOSPORIUM</i> SPP. (E) <i>DRECHSLERA</i> SPP. Y (F) <i>NIGROSPORA</i> SPP.....	53
FIGURA 9. MORFOTIPO 1, (A) CUERPOS FRUCTÍFEROS Y MASAS DE ESPORAS EN AGAR DE AVENA, (B) ESPORAS.....	56
FIGURA 10. PRUEBA DE PATOGENICIDAD <i>IN VITRO</i> EN VAINAS DE GANDUL, CULTIVAR I-8-3-1, UTILIZANDO CÁMARAS HÚMEDAS, (A) VAINAS DE GANDUL INOCULADAS CON <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> Y (B) VAINAS DE GANDUL CONTROL (NO INOCULADAS).	66

FIGURA 11. APRESORIOS DE LOS AISLADOS DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> , (A) COLLE 1, (B) COLLE 2, (C) COLLE 3, (D) COLLE 4 Y (E) COLLE 5, DONDE SE OBSERVAN DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS. LOS APRESORIOS DE CADA AISLADO SON DE COLOR MARRÓN, DE FORMAS VARIABLES DESDE OVALES, IRREGULARES A LOBULADOS.	70
FIGURA 12. (A) CONIDIOS DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> BAJO MICROSCOPIO NOMARSKI Y (B) SETAS OBSERVADAS BAJO MICROSCOPIO DE LUZ.	72
FIGURA 13. (A) PERITECIO DE <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> , ESTADO TELEOMORFO DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> Y (B) ASCAS Y ASCOSPORAS FORMADOS EN MEDIO DE AGAR AGUA.	73
FIGURA 14. VISTA LA SUPERFICIE DE UNA VAINA DE GANDUL INFECTADA CON <i>C. GLOESPORIOIDES</i> (COLLE 2), (A) LESIÓN.	74
FIGURA 15. (A-E) ACÉRVULOS DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> (COLLE 2) SOBRE VAINAS DE GANDUL INFECTADAS Y (F) ACERCAMIENTO DE LAS ESPORAS DEL ACÉRVULO.	75
FIGURA 16. (A-B) ESPORAS DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> (COLLE 2) SOBRE EL TEJIDO DE VAINAS DE GANDUL, (C) ESPORAS LOCALIZADAS CERCA DEL ESTOMA DE LA VAINA Y (D) ESPORAS ADHERIDAS POR SUSTANCIA MUSCILAGINOSA PRODUCIDA POR EL HONGO.	76
FIGURA 17. APRESORIOS DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> (COLLE 2) SOBRE EL TEJIDO DE VAINAS DE GANDUL.	77
FIGURA 18. GEL DEL PRODUCTO DE LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS MEDIANTE PCR, PARA LOS AISLADOS DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> EN AGAROSA 0.8%. M= MARCADOR 100 PB; 1-5= <i>C. GLOESPORIOIDES</i> (COLLE 1-5); C+= CONTROL POSITIVO (MORFOTIPO 1); CG= CONTROL POSITIVO (CEPA DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> CERTIFICADA POR CABI BIOSCIENCE, RU).	79
FIGURA 19. GEL DEL PRODUCTO DE UNA DIGESTIÓN DOBLE, UTILIZANDO LAS ENDONUCLEASAS <i>Bsa</i> HI Y <i>Hae</i> III, MEDIANTE RFLP, PARA LOS AISLADOS DE <i>C. GLOESPORIOIDES</i> EN AGAROSA 3%. A= MARCADOR 100 PB, B= MARCADOR 50 PB; 1-5= <i>C. GLOESPORIOIDES</i> (COLLE 1-5); C= CONTROL POSITIVO, MORFOTIPO 1.	81

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo del gandul [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] es uno de gran importancia, ya que es utilizado como fuente de alimento en países tropicales. El gandul contiene de 16 a 30% en proteína cruda de alta calidad y puede ayudar a balancear el contenido esencial de aminoácidos (Hepperly y Rodríguez, 1984). Este arbusto originario de la India o África occidental, mide de 3 a 6 pies, tiene hojas trifoliadas y generalmente sus flores son amarillas con rasgos rojizos. Produce vainas conteniendo de cinco a siete granos. Dagar y Dagar (1991) describen que en las Islas Nicobar, en la India, el gandul se utiliza en la medicina doméstica popular para tratar la tos. Coe y Anderson (1996) mencionan que en Nicaragua el gandul se utiliza para alimento y para tratar desórdenes pulmonares, problemas en la piel (salpullido) y cortaduras en la piel (actúa como desinfectante y cicatrizante). Algunos de los productos del gandul y sus derivados, son utilizados en Argentina, India, Java y China, Tailandia, Malagasia (Madagascar) y Bengala (CNCPP, 1997).

El Conjunto Tecnológico para la Producción de Gandules (1992) afirma que el gandul, por su aportación al ingreso generado por el sector agrícola, se ha convertido en la legumbre más importante para Puerto Rico. Hasta el año fiscal 1998 la mayor producción de gandules en Puerto Rico era para procesar (enlatado), sin embargo, debido a los bajos costos del gandul importado, todo el gandul enlatado que consumimos hasta el presente es importado de Perú,

Ecuador, República Dominicana y Brazil. Para el año fiscal 1998, se produjeron 10,000 qq de gandul para enlatar y 5,000 qq para mercado fresco. En el año fiscal 2005 se produjeron 4,805 qq de gandules frescos (Departamento de Agricultura, 2002; 2005).

El gandul puede ser afectado por distintas plagas entre las que se encuentran los insectos de las vainas (*Heliotis virescens*), la mosca *Melanagromyza obtusa*, nemátodos y enfermedades causadas por hongos como la roya y la antracnosis, entre otras (Conjunto Tecnológico para la Producción de Gandules, 1992). Los insectos pueden transportar y dispersar las esporas de diferentes hongos incluyendo ascomicetos, basidiomicetos, hongos imperfectos y cigomicetos. Las masas de esporas mucilaginosas de los cuerpos fructíferos se adhieren a las patas o al cuerpo del insecto dispersándolas a otros lugares y a otros cultivos (Abbott, 2002).

La antracnosis del gandul, causada por *Colletotrichum* spp., afecta la calidad de las semillas, reduce su rendimiento y disminuye su potencial como producto comercial, causando grandes pérdidas a los agricultores (Tu, 1988; Ntahimpera et al., 1996). Se ha informado que la antracnosis del gandul causa daños en la vaina, semilla, tallos y raíces. Las vainas presentan lesiones marrón oscuro o marrón con bordes rojos, en las que se pueden observar bajo el esteroscopio los acérvulos y masas de esporas de color rosa a salmón (Barnes, 1979).

Glomerella cingulata sp. es un organismo eucariota, perteneciente a la familia Phyllachoraceae de la división Ascomycota (Hawksworth et al., 1995). Su fase asexual corresponde al género *Colletotrichum gloeosporioides*. En agar de avena *C. gloeosporioides* presenta macroscópicamente una colonia con micelio poco algodonoso blanco con masas de esporas anaranjadas. Microscópicamente se caracteriza por fructificaciones acervulares con conidios hialinos fusiformes. Pueden observarse setas y apresorios al cultivarse en agar de avena, agar de papa y dextrosa, y agar de agua (Swart, 1999).

C. gloeosporioides muestra el mayor grado de diversidad morfológica y biológica y tiene rango más amplio de hospederos de todas las especies de *Colletotrichum* (Du et al., 2005). Von Arx (1957) clasificó las especies de *Colletotrichum* y las unió a *C. gloeosporioides* basándose en la similitud morfológica. Muchos investigadores han separado especies de *Colletotrichum*, en base a su especificidad de hospedero y sus características en el medio de cultivo (Du et al., 2005). También se pueden utilizar técnicas moleculares como alternativa complementaria para la identificación de las especies de *Colletotrichum* y para diferenciar entre aislados.

El método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) se utiliza para amplificar fragmentos de ADN. Mediante este método, con el uso del ADN, iniciadores o *primers* y enzimas de replicación (polimerasas de ADN) se generan copias de regiones específicas de la cadena de ADN (Starr y Taggart, 1998).

Las regiones *internal transcribed spacer* (ITS) y regiones intergénicas del rRNA nuclear, repiten unidades que evolucionan rápido y varían entre especies de un género (White et al., 1990). De esas regiones se han desarrollado *primers* que se utilizan durante el PCR para obtener muchas copias de estas regiones. Los patrones de bandas obtenidos de la electroforesis de ADN, mediante el método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), establece diferencias entre organismos. El método de RFLP ha demostrado ser útil para agrupar los aislados de *Colletotrichum* (Freeman et al., 1998). Los análisis directos de las secuencias de nucleótidos del ADN son útiles para establecer relaciones entre especies y complejos de especies de *Colletotrichum* (Du et al., 2005).

Las especies de *Colletotrichum* muestran un patrón típico en su proceso de infección. Las conidias del hongo llegan al hospedero y se adhieren a la cutícula de la planta. La espora germina y se forma un tubo germinativo (Jeffries et al., 1990). A partir del tubo germinativo se forma un apresorio muy característico para el género, de morfología limitada por un rango de variación (Parbery 1981; citado por Jeffries et al., 1990). Una vez el apresorio germina, se forma un gancho de penetración que crece atravesando la cutícula y penetrando las células epidermales. La hifa se disemina intracelular e intercelularmente, causando necrosis de las células y la formación de la lesión (Jeffries et al., 1990).

Una característica importante para la dispersión y adhesión de las conidias y ascosporas de muchas especies de *Colletotrichum*, es que estas están envueltas con una sustancia mucilaginosa hidrofílica. La sustancia mucilaginosa está compuesta principalmente de polisacáridos y glicoproteínas de alto peso molecular. Además, mantiene la viabilidad de las conidias bajo condiciones adversas como las temperaturas extremas, luz ultravioleta y humedad baja. Al mismo tiempo, protege las esporas de los materiales tóxicos producidos por los tejidos vegetales hospederos durante el desarrollo de una lesión (Wharton, 2001).

En la zona norte de Puerto Rico se ha observado en fincas privadas y experimentales, una infección severa en las vainas, causada por *C. gloeosporioides*. La rápida diseminación de la enfermedad puede ser causada por el uso de cultivares susceptibles y condiciones de alta humedad (Echávez y Alameda, 1998). Ciertas condiciones ambientales como la alta humedad, aumentan la probabilidad de producir esporas como inóculo primario y la dispersión de esporas entre las plantas (Ellis y Paschal, 1977 y 1979). El factor ambiental que más influye en el desarrollo de la antracnosis es la humedad alta. Otro factor clave es la temperatura que además, interactúa con la humedad (Wharton, 2001). Durante los períodos de lluvia, se forman acérvulos en la planta y las esporas son dispersadas por salpicaduras causadas por la lluvia, sobre la siembra y plantas adyacentes (Buchwaldt et al., 1996). Las semillas

contaminadas proveen inóculo, pero cualquier tejido contaminado o material vegetal en descomposición puede convertirse en un foco potencial de infección (Ellis y Paschal, 1977; 1979).

Muchos organismos utilizan la atmósfera para moverse de un hábitat terrestre a otro, algunos pasivamente, o mediante distintas características morfológicas que facilitan su movimiento, como la formación de apéndices (Isard y Gage, 2001). Muchos hongos han desarrollado estrategias para la dispersión de sus esporas en la atmósfera. Algunos han desarrollado estructuras para liberar las esporas por sí mismos, otros utilizan insectos como vectores y la mayoría tienen esporas aerotransportables, que pueden ser dispersadas por el viento o por salpicadura de lluvia. Estas esporas aerotransportables son las de mayor importancia en la fitopatología (Deacon, 1997).

Existen tres fases importantes en la dispersión aérea: la liberación de esporas, su dispersión y la deposición sobre el sustrato. La deposición de esporas puede ocurrir por sedimentación, en donde las esporas de mayor peso se asientan con mayor rapidez que las de menor peso. El impacto de esporas es la forma de deposición de mayor importancia para los patógenos de plantas. Las esporas más pesadas tienen mayor probabilidad de impactar. A medida que la velocidad del viento aumenta, las esporas más pequeñas pueden impactar alguna superficie. Otra forma de deposición es mediada por la lluvia, un

mecanismo más efectivo para remover las esporas del aire y depositarlas en superficies terrestres, como las plantas (Deacon, 1997).

Para conocer la diversidad de hongos con potencial patogénico en plantas, animales y seres humanos es importante estudiar la micoflora de un lugar. Estudiar la diversidad de hongos sobre una siembra de gandul nos provee información sobre los hongos con el potencial de iniciar el proceso de infección en la siembra. Es necesario realizar estudios sobre la diversidad de hongos en diferentes épocas del crecimiento de la planta para determinar en que momento abundan propágulos viables que pueden causar enfermedades.

A pesar de los daños asociados a la antracnosis en el gandul, se han realizado pocos estudios sobre la dinámica y distribución de esporas de hongos en siembras de gandul. Estudios sobre la distribución vertical de *Colletotrichum* spp. sobre una siembra de gandul comercial contribuirán al conocimiento sobre la ocurrencia de inóculo de este hongo que puede afectar al gandul. Este es el primer estudio de este tipo realizado en el Caribe.

Esta investigación tuvo como propósito: 1) estudiar la distribución vertical y temporal e incidencia de *G. cingulata*, causante de la antracnosis de la vaina del gandul, sobre una siembra comercial, 2) determinar como la cobertura de nubes, temperatura, humedad relativa, presión barométrica, punto de rocío y la velocidad del viento influyen en la cantidad de inóculo de *Colletotrichum* y de otros hongos recuperados, sobre una siembra de gandul y 3) caracterizar

morfológica, patogénica y molecularmente las especies de *G. cingulata* asociadas al cultivo del gandul.

Estos resultados proveerán información sobre la incidencia de este hongo en el aire, de manera que se puedan tomar medidas preventivas, tales como la aplicación de fungicidas recomendados para el cultivo y cambios en la época de siembra. Esto ayudará a la protección de las siembras del gandul y evitará pérdidas sustanciales.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Aspectos biológicos del género *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* Corda fue descrito por Tode en el 1790 bajo el nombre de *Vermicularia*, nombre que fue validado por Fries en el 1825 (Baxter et al., 1985). Penzig en el 1882, describió a *Vermicularia gloeosporioides*, hoy conocido como *C. gloeosporioides*, cuando fue aislado en Italia de las hojas de un cítrico (Walker, 1980). Más tarde, Saccardo en el 1884, transfirió a *Vermicularia* al género *Colletotrichum* y aplicó este nombre a los hongos habitantes de las hojas que eran similares a *Colletotrichum* (Baxter et al., 1985). *Colletotrichum* fue establecido como género por Corda en el 1831, quien lo describió como un hongo caracterizado por acérvulos setosos y conidias hialinas y fusiformes (Baxter et al., 1985).

El agente causal de la antracnosis del gandul fue identificado como *C. cajani* y descrito por primera vez en Brazil por Rangel en el 1916 (Kaiser, 1981). Kaiser (1981) menciona que la mayoría de los estudios realizados con gandul en PR, se han hecho por investigadores en Mayagüez y San Juan, desde principios del 1900. Tucker (1927) informó por primera vez la antracnosis del gandul en PR, causada por *C. cajani*, hoy conocido como *C. gloeosporioides*. Describió la antracnosis, causada por esta especie, como una enfermedad destructiva de las hojas, vainas y semillas del gandul. Esta enfermedad que tenía un porcentaje de

infección mayor durante las épocas de lluvia, causaba caída de las vainas y hojas, manchas, necrosis, deformación y reducción de las semillas. En las vainas se formaba una mancha circular casi negra con bordes violeta oscuro (Tucker, 1927).

Colletotrichum ha sido redescrito bajo diferentes géneros, siendo los dos más comunes *Vermicularia* y *Gloeosporium* Desm & Mont (Wharton, 2001). Han existido problemas para diferenciar a *Colletotrichum* de *Gloeosporium*. Inicialmente, en *Gloeosporium* su acérvulo glabroso era distintivo, pero más tarde se descubrió que este hongo podía desarrollar setas en algunos sustratos (Jeffries et al., 1990). Duke en el 1928, demostró que la presencia o ausencia de setas y su arreglo en el acérvulo son extremadamente variables y no son relevantes a nivel de género (Wharton, 2001). Von Arx (1957, 1970) redujo la confusión entre géneros al escribir monografías sobre *Colletotrichum*, en las que reduce cientos de taxones a 13 especies aceptadas. Además, combinó 600 sinónimos en ocho formas para *C. gloeosporioides*, basado en la variabilidad del cultivo, la especificidad del hospedero, pero las relaciones entre estas formas aún necesitan clarificación. Hoy día, aún existen problemas taxonómicos para *C. gloeosporioides* (Jeffries et al., 1990).

Glomerella cingulata (Stonem.) Spaulding & Schrenk se reconoce como el estado teleomorfo de *C. gloeosporioides*, pero no se ha relacionado con otros aislamientos de este taxón (Jeffries et al., 1990). Para algunas formas de *C.*

gloeosporioides, no se ha encontrado el estado teleomorfo, pero pueden ser diferenciados morfológicamente. Estas formas están estrictamente limitadas a una planta hospedera específica y tienen formas de crecimiento distintas en cultivo puro (Von Arx, 1970).

Glomerella spp. es un ascomiceto que desarrolla un peritecio bien variable en estructura y se pueden encontrar muchas formas genéticas diferentes, de fisiología variable y específicos para algunos hospederos o sustratos (Von Arx, 1970). Presenta un ascocarpo de 85-300 μm , marrón oscuro, con pocas ascas, clavadas y de pared fina, contenidas por hasta ocho ascosporas. Las ascosporas son truncadas, biseriadas y elipsoidales a fusiformes, hialinas, de pared lisa, mayormente con una medida de 10-21 x 4-6 μm (Domsch et al., 1980).

Von Arx (1970) describe el estado anamorfo de *Glomerella*, el género *Colletotrichum*, con acérvulos intra o subepidermales, con variaciones en tamaño y forma, glabrosos o setosos. Las setas son oscuras u ocasionalmente casi hialinas que surgen de la base del acérvulo. Las conidias son elipsoidales, cilíndricas y forman apresorios al germinar. Además, describe para *C. gloeosporioides* acérvulos oscuros o claros, setosos o glabrosos. Las conidias son cilíndricas o elipsoidales, redondeadas en los extremos, atenuadas o truncadas, hialinas y forman masas de esporas anaranjadas a rosadas.

C. gloeosporioides es un hongo de distribución cosmopolita predominante en los trópicos y subtropicos (Sutton, 1980). La especie muestra alta variabilidad morfológica por lo que se recomienda que la diferenciación debe realizarse mediante la integración de características ecológicas, morfológicas y moleculares, además, mediante pruebas de hospedero y patogenicidad (Sutton, 1980). Menciona que se han utilizado diferentes criterios para la diferenciación de taxones en *Colletotrichum*, pero a consecuencia del amplio rango de variabilidad de *C. gloeosporioides* es ineficiente proveer una descripción estandarizada. Aun así, describe las conidias de esta especie como rectas, obtusas en el ápice, con una medida de 9-24 x 3-4.5 μm y con apresorios de 6-20 x 4-12 μm .

Una herramienta adecuada para la identificación de *Colletotrichum* spp. es la medida de sus apresorios. Para muchos hongos fitopatógenos, el apresorio es la estructura más importante en la invasión del hospedero. Éste aumenta el área de superficie y permite la adhesión del hongo a la planta hospedera. Además, provee la fuerza mecánica, las enzimas necesarias para la penetración y promueve la sobrevivencia en condiciones adversas (Hutchison et al., 2000).

La antracnosis causada por *Colletotrichum* spp., afecta diferentes cultivos, como el gandul, la fresa, el mangó, la papaya, el aguacate, la manzana, la almendra, la lenteja, el algodón, el café y el guineo, entre otras plantas. Se han reportado varias especies de *Colletotrichum* afectando los cultivos de gandul

entre ellas: *C. crassipes* (Speg.) Von Arx y *Colletotrichum* sp. en Zambia, *C. dematium* (Pers.) Grove, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., y *C. truncatum* (Schw.) en la India (Wajid Khan y Singh, 1974; Lenné, 1992).

Según Buddie et al., (1999) en su estudio y en otros estudios citados por Buddie (Bruns et al., 1991; Grondona et al., 1997) se ha demostrado que *Colletotrichum* spp. tiene subdivisiones sistemáticas y estos grupos pueden ser divididos en otros subniveles. Esta afirmación esta basada en el análisis de distintas partes del genoma, que podrían reflejar diferentes niveles de jerarquía taxonómica.

El problema con la taxonomía de *Colletotrichum* spp. reside en que produce conidias secundarias provenientes de las conidias de germinación inicial. Estas esporas secundarias generalmente son variables en tamaño y dificultan la identificación (Buddie et al., 1999). Debido a estos problemas se han utilizado una variedad de métodos moleculares para discriminar entre especies de *Colletotrichum* ya que los criterios morfotaxonómicos no son precisos (Freeman et al., 1996). En otro estudio realizado por Freeman y Rodríguez (1995) se identificó que existe variación entre las especies identificadas como *C. gloeosporioides*. Denoyes-Rothan et al., (2003) estudiaron patrones de RAPD de 14 aislados de *C. gloeosporioides* y estos patrones mostraron un alto nivel de polimorfismo entre aislados. En otro estudio realizado por Brown et al., (1996) se estudiaron diferentes aislados de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* y se

amplificó el ADN ribosomal por el método de PCR con los *primers* específicos (*Calnt2* y *Cglnt*) y el *primer* ITS4. A través de la secuenciación de nucleótidos complementado con el método RFLP, se pudieron reclasificar los aislados de *C. acutatum* previamente clasificados como *C. gloeosporioides*, basados en la morfología de los conidias.

Chongo y Bernier (2000) realizaron un estudio con lenteja donde se determinó que el desarrollo de la antracnosis en esta planta está influenciado por el genotipo de la planta hospedera, debido a que existen variedades más resistentes. Al aumentar la concentración del inóculo, disminuyó el tiempo requerido para la formación de lesiones y la primera esporulación. El período de humedad influyó en el desarrollo de la antracnosis. Se observó que luego de 24 horas de un período de alta humedad, la enfermedad fue más severa. La severidad de la antracnosis fue mayor en un rango de 20 a 28 C, bajo y sobre el rango la severidad disminuyó. Concluyeron que las plantas, en todas sus etapas de crecimiento, fueron infectadas por *Colletotrichum truncatum*. El período de cuatro a seis semanas luego de la producción de semillas fue óptimo para la infección para todos los genotipos de plantas.

Yang et al., (1980) demostraron en su estudio que *C. acutatum* es dispersado en una siembra de fresas por salpicaduras de lluvia. La intensidad de la lluvia influye la razón de liberación de esporas del recurso de inóculo. Ntahimpera et al., (1997) utilizaron el método de exposición de plato por dos a tres minutos,

luego de períodos de 12 y 27 minutos de lluvia simulada sobre una siembra de fresas, con el propósito de evaluar el efecto de la dispersión por lluvia de *C. acutatum*. Luego de la exposición de plantas sanas cerca de la fuente de inóculo, se encontró que la infección fue mayor en plantas colocadas más cerca del inóculo. En el 1999, Ntahimpera et al., demostraron que *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae* presentaban patrones similares entre sí, en términos de dispersión por salpicaduras de lluvia.

En un estudio sobre la antracnosis causada por *Colletotrichum musae* en guineo, se evaluó la importancia de la lluvia en la dispersión de conidias. Se cubrieron las flores de la mitad de las plantas y la otra mitad se dejó al descubierto. Se encontró que en las plantas cubiertas el flujo de la lluvia estaba restringido y por consiguiente también el transporte de conidias. La contaminación de las plantas estuvo altamente correlacionado con la lluvia (De Lapeyre de Bellaire et al., 2000).

En el 1984, Hepperly y Rodríguez estudiaron la micoflora de la semilla del gandul en almacenaje y en el campo en Puerto Rico. Entre los géneros de hongos asociados al gandul se reportó *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Phomopsis*. *C. gloeosporioides* se encontró en las semillas con una frecuencia igual o menor a un quince por ciento.

En estudios preliminares en la Estación Experimental Agrícola (EEA) de Isabela se recolectaron esporas por exposición de plato y un 37% de las colonias obtenidas fueron representadas por el género *Colletotrichum* (Gaztambide sin publicar, 2003). En la EEA y en una siembra privada en Isabela, se obtuvieron de vainas de gandul, dos aislados de *C. gloeosporioides* con diferencias en virulencia, siendo los aislados de la siembra privada significativamente más virulentos (Alameda et al., 2001). Se ha observado que la antracnosis, causada por *C. gloeosporioides* es una enfermedad cíclica. Cada cinco a siete años la enfermedad afecta significativamente las siembras de gandul en Puerto Rico (Bosques, com. pers., 2004).

2.2 Aerobiología de *Colletotrichum*

Colletotrichum truncatum produce acérvulos en las lesiones, en donde se forman las conidias que son dispersadas por las gotas de lluvia a plantas vecinas. En todas las plantas infectadas se forman microesclerocios que permanecen en el campo como estructuras de resistencia. En un estudio realizado por Buchwaldt et al., (1996) se estudió la distribución rápida de la antracnosis en la lenteja (*Lens culinaris* Medik.) causada por esta especie. Se determinó que la dispersión del hongo ocurría a través de la semilla, pero se encontraba en un 2%, aún en períodos de infección severa. Por tal razón, se estudiaron los materiales transportados por el viento tales como: residuos de las

cosechas, polvo, desechos orgánicos y muestras de suelo, como potencial recurso de inóculo (Buchwaldt et al., 1996).

Los investigadores colocaron hojas de polietileno de 1m² en el suelo por seis horas, para la recolección de esporas. Se recolectó el polvo depositado en una aspiradora, se pegó cinta adhesiva sobre el polvo y se tiñó con lactofenol con azul de algodón. Mediante análisis microscópico se determinó que *C. truncatum* tiene un período de sobrevivencia en los residuos de la cosecha, de aproximadamente dos años (Buchwaldt et al., 1996). Se encontró que la predominancia de la antracnosis en lenteja en el este de Canadá ha sido facilitada por la dispersión de inóculo por las nubes de polvo que se levantan de residuos de lenteja y del suelo por los vientos predominantemente en el otoño, y no por salpicaduras de lluvia. Esta dispersión por viento explica la infección en otras variedades de plantas sembradas en lugares en donde no se ha sembrado lenteja (Buchwaldt et al., 1996).

2.3 Aspectos de la Aerobiología de hongos

Ingold en el 1953, discutió los mecanismos por los cuales las esporas se vuelven aéreas, su dispersión y liberación. Tradicionalmente se ha utilizado el método de exposición de plato para documentar la presencia de esporas de hongos sobre diversos cultivos. Para estudiar la incidencia de esporas sobre una siembra de maíz, Bothast et al., (1977) utilizaron el método de exposición de

platos, ya que tiene similaridad en la exposición de la planta a las esporas de hongos. Se reportó una baja incidencia de esporas de *Aspergillus flavus* en siembras de maíz en Georgia, Illinois, Maryland, Carolina del Sur y Virginia. *Alternaria* y *Epicoccum* fueron los géneros predominantes. Afzal y Mehdi (2002) muestrearon el aire a diez pies de altura sobre la ciudad de Karachi, Pakistán e identificaron 53 especies pertenecientes a 21 géneros. Los géneros más frecuentes fueron *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Cladosporium*.

El transporte aéreo de esporas es responsable de dispersar enfermedades en plantas a través de distancias de 500 km ó más (Aylor, 1986). La roña del árbol de manzana es causada por el hongo *Venturia inaequalis*. Aylor y Anagnostakis (1991) estudiaron la concentración aérea de ascosporas de *V. inaequalis* sobre una siembra de manzanas y demostraron que hay un rápido descenso de concentración de ascosporas al aumentar la altura sobre la tierra. Este cambio importante en la distribución vertical fue explicado por un cambio rápido en la velocidad del viento y un movimiento turbulento del viento sobre la tierra.

Se ha reportado que las infecciones de la manzana están relacionadas cuantitativamente a la concentración aérea de ascosporas en el aire rodeando tejido susceptible de manzana. Utilizando un atrapador de esporas Rotorod se pudo determinar que la probabilidad de las infecciones aumenta a medida que el

número de ascosporas en el aire sobre la siembra de árboles de manzana aumenta (Aylor, 1998).

Se han reportado una variedad de patógenos de dispersión aérea sobre plantas de importancia económica. La propagación a través de Europa de *Blumeria graminis*, patógeno de la cebada, se debe a la dispersión aérea de sus esporas (Limpert et al., 1999). Las esporas de especies de *Phytophthora*, un oomiceto responsable de pérdidas económicas significativas en diversas plantas, pueden ser dispersadas por el aire (Beagle, 2000). *Pyricularia grisea* y *Bipolaris oryzae* también producen esporas que se dispersan en la baja atmósfera sobre siembras de arroz y afectan el cultivo en diferentes épocas de su crecimiento (Picco y Rodolfi, 2002).

Las ascosporas y las conidias de *Stemphylium vesicarium* se liberan en el aire, causando tizón de la hoja del ajo. La lluvia está directamente relacionada con la liberación de sus esporas, pero una alta humedad relativa es esencial si no llueve (Prados-Ligero et al., 2003). *Gibberella zeae* causante del tizón de las cabezuelas es una enfermedad que afecta el trigo y otros cereales. Sus esporas se dispersan a través del aire y sus eventos de mayor deposición son primordialmente en la noche (Del Ponte et al., 2005). Maldonado-Ramírez et al., (2005) estudiaron la liberación, dispersión y deposición de las ascosporas de *G. zeae* y encontraron que las esporas viables de este hongo fueron abundantes

durante cada hora del día y la noche. Además, encontraron que las esporas fueron más abundantes en días nublados.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estudio preliminar en siembra de gandul

Se realizó un estudio preliminar para determinar las especies de *Colletotrichum* asociadas a una siembra comercial de gandul de la línea I-8-3-1, establecida en la EEA de Isabela, Universidad de Puerto Rico-RUM. La siembra se estableció el 14 de julio de 2003 y constaba de aproximadamente 14,520 plantas de gandul, en un predio de un acre. Se realizaron tres muestreos del aire, utilizando el método de exposición de plato. El primer muestreo se realizó durante la floración, el segundo durante la producción de vainas y el tercero durante el llenado de vainas. Se seleccionaron cinco puntos de exposición de platos en la siembra, en los puntos medios de los lados de la siembra y en el centro de la siembra. En cada punto se expusieron tres platos Petri sobre el suelo por 15 minutos y al cabo de estos, los platos se removieron y se colocó la misma cantidad de platos por 10 minutos. En el primer muestreo se utilizó agar de papa y dextrosa, en el segundo agar de extracto de malta y en el tercero agar de avena. También se muestreo el suelo, hojas, flores, ovario de las flores, semillas, vainas de gandul y hojas secas de otras plantas que se encontraban en el suelo.

3.2 Muestreo de siembra de gandul

Para estudiar la distribución vertical y temporal de *Colletotrichum* spp. se seleccionó una siembra de gandul comercial, establecida en la EEA de Isabela, Universidad de Puerto Rico-RUM (Figura 1). El predio de la línea I-8-3-1, fue sembrado el 21 de diciembre de 2003. Este predio era circundado por calles internas al norte y oeste, por la carretera #2 al este y en el sur colindaba con otro predio de gandul. Se tomaron nueve muestras en cada una de las cuatro etapas de crecimiento de las plantas: a) cuando la planta aún no había producido flores (7 de febrero de 2004), b) durante floración (6 de marzo de 2004), c) durante producción (18 de abril de 2004) y llenado de vainas y, d) luego de la cosecha de las vainas (19 de junio de 2004).

3.3 Preparación de laminillas con superficie adhesiva

Las laminillas con superficie adhesiva (2.54 cm x 7.62 cm), se prepararon utilizando una mezcla de nueve mL de hexano y un gramo de vaselina, en un tubo de centrifuga estéril. La solución se agitó hasta crear una mezcla homogénea, que se aplicó sobre una laminilla limpia con un hisopo estéril, hasta cubrir toda la laminilla excepto sus extremos (8-10 mm).

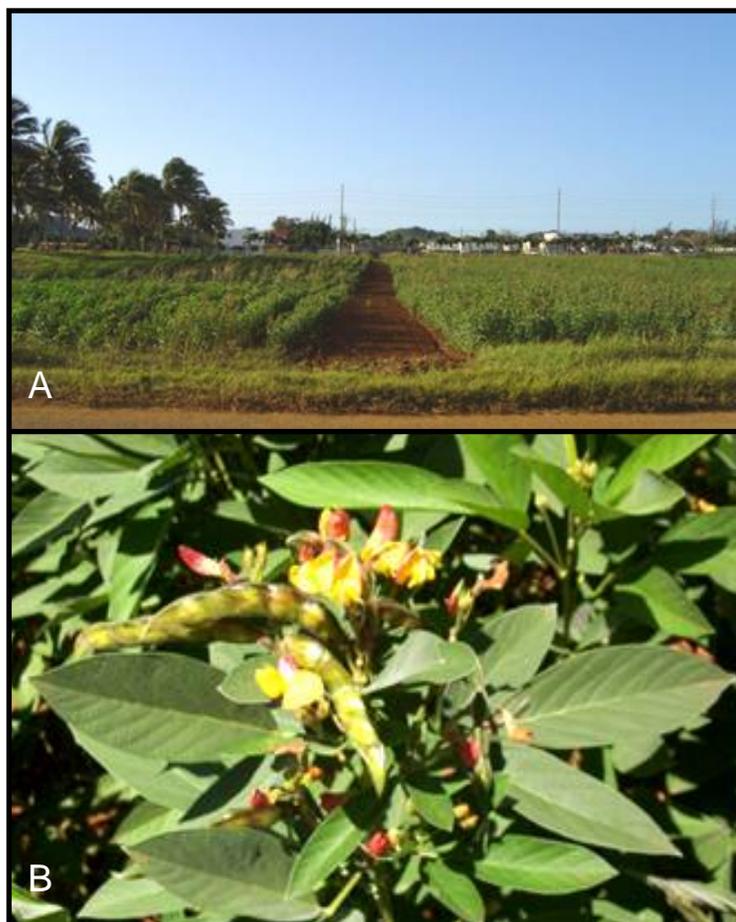


Figura 1. (A) Vista general y (B) planta con flores y vainas maduras en detalle, de la siembra de gandul comercial muestreada, localizada en la Estación Experimental Agrícola de Isabela, PR.

3.4 Exposición de platos Petri y laminillas con superficie adhesiva

En el primer muestreo se realizaron tres exposiciones de platos Petri pequeños (60 x 15 cm) con Agar de Avena (AA) suplementado con ácido láctico al 25%, al extremo norte de la siembra de gandul. Se colocaron horizontalmente, tres platos Petri para cada altura de 94, 137 y 180 cm, sustituidos cada 30 minutos en un período de dos horas (10:30 am a 12:30 pm). Para analizar estadísticamente diferentes variables de este muestreo, se utilizó un análisis de correlación, análisis de regresión múltiple por el método *forward selection* y un análisis no paramétrico mediante *proc rank*.

En el segundo, tercer y cuarto muestreo, para recuperar esporas viables y no viables, se expusieron platos Petri pequeños y laminillas adhesivas en nueve ocasiones: tres veces de 9:00 a 11:00 am, las siguientes tres de 2:00 a 4:00 pm y las últimas tres de 5:00 a 7:00 pm, en intervalos de aproximadamente media hora. En el cuarto muestreo no se realizaron los últimos tres períodos de toma de muestras debido a lluvia. Se monitorearon las condiciones ambientales utilizando un instrumento que registra datos de temperatura, humedad relativa, presión barométrica, punto de rocío y velocidad del viento (Kestrel 4000, Nielsen-Kellerman, Pennsylvania, USA), durante cada período de cada exposición y además se monitoreó visualmente la cobertura de nubes.

Para realizar los muestreos aerobiológicos, se diseñó una torre con atrapadores de esporas, que fue ubicada en el centro de la siembra (Figura 2). En ésta se colocaron verticalmente, a una altura de 140 y 290 cm del suelo, cuatro platos Petri (60 X 15mm) conteniendo AA suplementado con ácido láctico al 25%. Los platos y las tapas fueron separados mediante control remoto, exponiéndolos durante diez minutos. Los platos expuestos se volvieron a cerrar mediante control remoto, se desmontaron de la torre y se sellaron con parafina.

Al finalizar los muestreos, los platos se transportaron al laboratorio y se incubaron a 26 ± 2 C hasta observar el desarrollo de colonias con las características distintivas de *Colletotrichum* spp. Como control se utilizaron dos platos Petri pequeños cerrados con AA. Estos también fueron incubados junto con los platos expuestos. Las colonias recuperadas se aislaron y purificaron en AA y fueron incubados a 26 ± 2 C por 7-10 días. Luego del período de incubación y análisis microscópico, se utilizaron claves taxonómicas para identificar los hongos miceliales, a partir de una modificación al método de cámara húmeda. Mediante éste método, los hongos fueron inoculados en AA para obtener un cultivo puro y los cubreobjetos esterilizados fueron enterrados parcialmente en forma diagonal en el agar, cerca del lugar de inoculación. Los hongos carentes de estructuras de reproducción (HCER), se transfirieron a agar de papa y dextrosa (APD) y/o en agar de agua y se expusieron a temperatura ambiente con irradiación solar de siete a catorce a días para estimular su esporulación.



Figura 2. (A) Atrapador de esporas conteniendo los platos Petri, localizado en medio de la siembra de gandul comercial, (B) Monitor Kestrel 4000 para medir las condiciones ambientales al momento del muestreo, (C) acercamiento del muestreador conteniendo los platos Petri.

Se realizaron preparaciones semipermanentes con lactofenol con azul de algodón, se observaron utilizando un microscopio compuesto y se utilizaron claves taxonómicas para identificar los géneros de hongos miceliales correspondientes a las esporas viables recuperadas en AA. Un hongo desconocido, identificado como morfotipo 1, se describió macroscópicamente, microscópicamente, se le realizó PCR, RFLP y secuenciación del ADN, ya que no pudo ser identificado mediante claves taxonómicas.

Simultáneamente a la exposición de platos Petri, se colocó una laminilla con superficie adhesiva a 140 y 290 cm de altura, para recuperar esporas no viables que no crecen en medios de cultivo, durante cada muestreo. Las laminillas se transportaron al laboratorio donde se les añadió una gota de lactofenol con azul de algodón y se le colocó un cubreobjeto (22 x 50 mm) a cada una.

A través de este estudio, se calculó la frecuencia de aislados de *Colletotrichum* spp. sobre la siembra y su distribución temporal, para determinar la época en que el inóculo era más abundante. Además, se calculó la frecuencia de recuperación de las esporas viables de otros géneros de hongos, en medios de cultivo durante los muestreos. La frecuencia se calculó dividiendo los aislados de cada género entre el total de aislados para cada muestreo.

Los análisis estadísticos del primer, segundo y tercer muestreo se realizaron separados del primer muestreo, ya que la metodología utilizada fue distinta. Para el segundo, tercero y cuarto muestreo, se dividieron los nueve períodos en tres

períodos durante la mañana, en la tarde y en la noche. Todos los datos numéricos obtenidos se analizaron estadísticamente por medio del programa SAS System (versión 8.0, 1999). Para analizar estadísticamente diferentes variables en estos muestreos se realizó un análisis no paramétrico mediante *proc rank* y un análisis de varianza (Tukey) para los hongos más frecuentemente aislados (*Fusarium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Alternaria* y HCER).

En el primer muestreo se correlacionaron las condiciones climáticas y el total de aislados utilizando un análisis de correlación y un análisis de regresión múltiple por el método *forward selection*. En el segundo, tercero y cuarto muestreo, para determinar la correlación entre las condiciones climáticas y el total de aislados, se utilizó un análisis de regresión múltiple. Además, se correlacionaron las condiciones climáticas y los hongos aislados en mayor frecuencia, mediante un análisis de regresión múltiple. También, se analizó la cobertura y el tipo de nubes sobre la siembra durante cada período de exposición, en los cuatro muestreos realizados. A la cobertura y el tipo de nubes se le asignó un valor numérico simbólico para realizar el análisis.

3.5 Evaluación del tejido vegetal

El tejido vegetal fue evaluado para determinar la ausencia o presencia de *Colletotrichum* spp., como posible fuente de inóculo. Se evaluaron las hojas de una maleza, la cual presentaba lesiones color vino (Figura 3) y las hojas, flores y



Figura 3. (A) Hojas de gandul y (B) de yerba guinea (*Urochloa maxima*) (indicado por las flechas) con lesiones, entre la siembra de gandul, analizados para determinar su relación con la dispersión y fuente de inóculo de *Colletotrichum* spp.

capullos del gandul (Figura 4). Para esto se prepararon platos Petri grandes conteniendo AA suplementado con ácido láctico al 25%. El tejido vegetal se desinfectó con un lavado con etanol 70% por un minuto seguido de un lavado hipoclorito de sodio al 0.05% por un minuto y tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego se colocaron en platos Petri estériles y dejaron secar dentro de una cámara de flujo laminar para eliminar el exceso de agua.

El muestreo de las hojas de gandul y de yerba guinea (*Urochloa maxima*) se realizó cuando las plantas aún no habían florecido. Luego de ser desinfectadas, se sembraron 10 pedazos de hojas de gandul y 10 pedazos de hojas de yerba guinea en los platos Petri preparados. También se seleccionaron flores y capullos del gandul para su evaluación. Se desinfectaron 20 capullos y 20 pétalos. Los capullos se cortaron por la mitad y cada mitad se sembró en un plato Petri. Se sembraron dos pedazos de pétalo en cada plato Petri. Los platos Petri fueron incubados a 26 ± 2 C durante siete días. Luego del período de incubación, se prepararon laminillas semipermanentes con lactofenol con azul de algodón para realizar el análisis microscópico de las colonias y se utilizaron claves taxonómicas para identificar los hongos miceliales.



Figura 4. Flores y capullos de gandul analizados para determinar su relación con la dispersión y fuente de inóculo de *Colletotrichum*.

3.6 Evaluación de la pupas de la mosca *Melanagromyza obtusa*

Las larvas de la mosca *Melanagromyza obtusa* barrenan las vainas del gandul, donde luego se forma la fase de pupa; por lo que se evaluó la presencia o ausencia de *Colletotrichum* en las pupas, para determinar la relación de éstas con la dispersión del hongo. Se escogieron vainas que tenían un orificio de aproximadamente un milímetro, característico de vainas infectadas por la larva. Se seleccionaron 15 pupas del interior de las vainas y se desinfestaron con un lavado con etanol 70% por un minuto, seguido de un lavado con hipoclorito de sodio 0.05% por un minuto y tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego se colocaron en platos Petri estériles y dejaron secar dentro de una cámara de flujo laminar para eliminar el exceso de agua. Las larvas se seccionaron a la mitad con un escarpelo estéril y cada sección se sembró en un plato Petri grande conteniendo AA suplementado con ácido láctico al 25%.

Los platos Petri fueron incubados a 26 ± 2 C durante siete días. Luego del período de incubación, se prepararon laminillas semipermanentes con lactofenol con azul de algodón para realizar el análisis microscópico y se utilizaron claves taxonómicas para identificar los hongos miceliales.

3.7 Preparación de cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp.

Se prepararon cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. para llevar a cabo la extracción de ADN, las pruebas de patogenicidad y subcultivos necesarios. Cada aislado de *Colletotrichum* spp. se cultivó por siete a quince días. Con esporas del hongo se prepararon en diluciones seriadas de (10^1 - 10^4) en tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada. Se transfirió una alícuota de 0.1 mL de cada dilución, a platos Petri grandes con agar de agua. Los platos se incubaron 26 ± 2 C por 24 hrs. Luego de la incubación, se observaron los platos bajo el estereoscopio y con una aguja de inoculación se aisló una espора germinada y se transfirió a AA. Los platos se incubaron 26 ± 2 C por siete días.

3.8 Pruebas de patogenicidad de cultivos de *Colletotrichum* spp.

Se seleccionaron vainas de la línea I-8-3-1 de gandul, sin lesiones, en etapa de llenado. Éstas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.05% por 2 minutos, seguido un lavado con etanol 70% por 2 minutos y tres enjuagues con agua destilada estéril. Las vainas se colocaron en platos Petri estériles y dejaron secar dentro de una cámara de flujo laminar para eliminar el exceso de agua. Con una aguja de inoculación estéril se tomaron esporas de cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. y se transfirieron a tubos de ensayo

individuales con 15 mL de agua destilada estéril. Utilizando un espectrofotómetro (Spectronic 20, Milton Roy) se midió una absorbancia de 0.1% de cada aislado para obtener una dilución de esporas de aproximadamente 10^{-6} mL. Se inocularon cinco vainas por un lado con la suspensión de esporas y se colocaron en una cámara húmeda estéril, sobre dos varillas de vidrio y papel toalla húmedo de fondo. Se prepararon cinco repeticiones con cinco vainas para cada suspensión de cada aislado. Como control se prepararon cinco repeticiones con cinco vainas desinfectadas sin inocular. Se prepararon cinco bloques en bandejas de aluminio donde se colocó un plato con las vainas inoculadas y un plato control con vainas sin inocular. Los platos dentro de cada bloque se ubicaron al azar y los bloques se situaron al azar. Los bloques se envolvieron en una bolsa plástica y se incubaron a temperatura ambiente por siete días. Se tomaron datos de la severidad de la antracnosis de las vainas en una escala de cero a nueve ó de 0-100% (0-10% resistentes, 11-39% intermedio y 40-100% susceptible) a los cinco y siete días después de inoculadas de acuerdo a Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987). La severidad de las cinco vainas inoculadas con cada aislado del hongo fue promediada. Los datos numéricos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza, utilizando el programa SAS System (versión 8.0, 1999).

3.9 Preparación de cámaras húmedas para la formación de apresorios y esporas de *Colletotrichum* spp.

Se esterilizaron platos Petri de cristal con una laminilla y dos cubreobjetos sobre una varilla de vidrio. Se cortaron bloques (1 cm²) de agar de agua y se colocaron sobre la laminilla y cada bloque se inoculó con esporas de cada uno de los cinco cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. Se colocó un cubreobjeto esterilizado sobre cada bloque de agar. Los platos se incubaron por siete días a 26±2 C. Los cubreobjetos se removieron de las cámaras húmedas y se colocaron en lamillas limpias. A cada laminilla se le añadió una gota de lactofenol con azul de algodón y se observaron bajo un microscopio de luz. Se midió el ancho y el largo de 50 apresorios y esporas utilizando el objetivo de 40x.

3.10 Preparación de vainas de gandul para ser observados por un microscopio electrónico de rastreo

Se seleccionaron vainas de gandul sin lesiones, en etapa de llenado, de la línea I-8-3-1 y se desinfectaron hipoclorito de sodio al 0.05%, por 2 minutos, seguido un lavado con etanol 70% por 2 minutos y tres enjuagues con agua destilada estéril. Las vainas se colocaron en platos Petri estériles y dejaron secar dentro de una cámara de flujo laminar para eliminar el exceso de agua. Con una aguja de inoculación estéril se tomaron esporas de cultivos

monospóricos de *Colletotrichum* spp. y se transfirieron a tres tubos de ensayo individuales con 25 mL de agua destilada estéril. Se inocularon cuatro vainas con la suspensión de esporas, de concentración desconocida, y se colocaron en una cámara húmeda estéril, sobre dos varillas de vidrio y papel toalla húmedo de fondo. Se prepararon cuatro repeticiones de cuatro vainas. Los platos se colocaron en una bandeja plástica envuelta con una bolsa plástica a temperatura ambiente por cuatro días.

Al finalizar el período de incubación todas las vainas presentaban lesiones en estados avanzados de infección y lesiones típicas (hundidas, de borde levantado y necróticas) de *C. gloeosporioides*. Se seleccionaron lesiones en un estado de infección no avanzado y se cortaron de 15 a 20 pedazos de la lesión (aproximadamente 2 x 5 mm), incluyendo tejido sano. Las muestras de vainas se fijaron a temperatura ambiente por 24 horas, con glutaraldehído al 4%, en amortiguador de fosfato con un pH de 7.2 (28 mL de fosfato de sodio monobásico 2.0 M y 70 mL de fosfato dibásico 2.0 M). Se utilizó un horno de vacío (VWR Scientific modelo 1410 Vacuum Oven), equipado con una bomba rotativa (Welch 1405 Duo Seal Vacuum Pump) para remover el aire de las muestras. Se realizaron cuatro lavados de 15 minutos con amortiguador de fosfato. Las muestras se deshidrataron mediante una serie de diluciones de etanol con las siguientes concentraciones: 10, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 y 100%. Los cambios entre cada dilución de etanol se realizaron cada hora. Para

remover el etanol de las muestras se utilizó una secadora de punto crítico (EMS, modelo 850). Luego, las muestras se colocaron en bases de aluminio, sobre una cinta adhesiva de carbón y se cubrieron con oro, utilizando un ISI PS-2 Sputter Coater. Los detalles de las muestras se observaron en un microscopio electrónico de rastreo (JEOL 5410 LV). Las imágenes se adquirieron con un Digital Scan Generator (JEOL, USA Inc).

3.11 Extracción del ADN ribosomal de *Colletotrichum* spp.

Los cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. se inocularon en agar de avena y se incubaron a 26 ± 2 C por cinco a siete días (protocolo de extracción de ADN de Cenipalma Colombia, modificado por Díaz (sin publicar, 2004) y Gaztambide (sin publicar, 2005).

Se removió el micelio y las esporas del hongo de la superficie del agar mediante raspados y se transfirió a un microtubo. La masa micelial se maceró con la punta de la pipeta en un microtubo de 2 mL con 100 μ L de amortiguador de extracción (2.5 mL de Tris-HCl pH 8.0- 50 mM, 5 mL de NaCl 5 M, 5 mL de EDTA 0.5 M- pH 8.0, 1 mL de mercaptoetanol). Se añadieron aproximadamente 0.3 g de cuentas de cristal de 0.5 mm (BIOSPEC Products Inc.) a las muestras y se colocaron en un disruptor de células (Disruptor Genie, Scientific Industries Inc.) por 15 minutos. Se añadieron 700 μ L de amortiguador de extracción y 50

μL de SDS al 10% a las muestras y se mezclaron por 30 segundos con un agitador (Fisher Touch Mixer, Modelo 231, Fisher Scientific). Éstas se incubaron a 65 C por una hora. Al finalizar, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos. Se tomaron 700 μL del sobrenadante y se añadió igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (5 mL cloroformo: 208 μL alcohol isoamílico). Durante 30 segundos, se agitó la mezcla en un Vortex y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos. Se recuperaron 500 μL de sobrenadante y se agregaron 50 μL de acetato de sodio 5 M y 300 μL de isopropanol frío. Se incubaron a -20 C durante la noche.

Luego de la incubación, la muestra descongelada se centrifugó a 6000 rpm por diez minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70% a 14 rpm por cinco minutos. Se decantó el etanol y los microtubos abiertos se colocaron sobre una servilleta, hasta que cada precipitado se secó. El precipitado se resuspendió en 50 μL de RNAsa [1.6 μL RNAsa *stock* (826 μL de agua Sigma, 10 μL Tris-HCl 1M pH 8, 164 μL RNAsa líquida) y 45 μL agua Sigma, por muestra] y se mezcló suavemente con la punta de la micropipeta. En un microtubo se mezclaron 5 μL de ADN, 2 μL de tinte azul de xileno, 5 μL de TE 1X y se añadieron estos 12 μL en el gel de electroforesis. Se utilizaron 3.6 μL de marcador de 100 pares de base (Promega). Se preparó una gel de agarosa al 0.8% con 0.9 μL de bromuro de etidio y se corrió a 100 voltios por aproximadamente 5 minutos y luego a 150 voltios por

aproximadamente una hora. La calidad de la extracción del ADN se examinó en un transiluminador (Quantity One 4.3, Bio Rad). Las absorbancias y concentraciones de los productos de la extracción de ADN se midieron en un espectrofotómetro (Smart Spec Plus, Bio Rad).

3.12 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de aislados de *Colletotrichum* spp.

La metodología de PCR fue utilizada para la amplificación o creación de múltiples copias de la región *Internal Transcribed Spacer* (ITS) del ADN ribosomal (Promega, Madison, WI). Se preparó una reacción de 25 μ L la cual consistía de 12.5 μ L PCR Master Mix (Promega), 1.65 μ L de *upstream primer* ITS 1, 1.65 μ L de *downstream primer* ITS 4, 1-3 μ L de ADN (10-20 ng) y agua libre de nucleasa (Promega) hasta completar 25 μ L. Se utilizaron dos controles positivos, uno de *C. gloeosporioides* identificado por CABI Bioscience (Reino Unido) y otro utilizando el morfotipo 1. Además se utilizó un control negativo utilizando los mismos reactivos sin ADN, para una reacción de 10 μ L. El protocolo utilizado consistía de una denaturalización inicial a 95 C por 2 minutos, 30 ciclos: denaturalización a 95 C por 1 minuto, alineación a 56.5 C por 1 minuto, extensión a 72 C por 1 minuto y extensión final a 72 C por 5 minutos (BioRad, i-Cycler Termal Cycler) . La calidad del PCR fue examinada en un transiluminador (Quantity One 4.3, Bio Rad). Las absorbancias y concentraciones del producto

de PCR se midieron en un espectrofotómetro (Smart Spec Plus Spectrophotometer, Bio Rad).

3.13 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de *Colletotrichum* spp.

Se utilizó el método de RFLP para determinar si las endonucleasas *Bsa*HI y *Hae*III cortan la secuencia de nucleótidos de *Colletotrichum* en lugares diferentes o iguales, que se podría observar con patrones de bandas en posiciones diferentes o iguales entre los aislados. Para esto se purificó el producto de PCR con *MinElute PCR Purification kit*. Se realizaron reacciones de 10 μ L, utilizando las endonucleasas *Bsa*HI (corta en GCGC) y *Hae*III (corta en GGCC) (0.3 μ L de cada una), 300 ng de PCR purificado, amortiguador y agua (de ser necesaria para completar la reacción a 10 μ L). Las muestras se colocaron a 37 C por una hora, se añadió la misma cantidad de las enzimas a cada muestra y se incubaron por un máximo de seis horas a 37 C. Se corrió un gel de agarosa al 3%, con marcadores de 100 y 50 pb a 110 voltios, por aproximadamente tres horas y se observó en un transiluminador (Quantity One 4.3, Bio Rad).

3.14 Análisis Bioinformático

Las regiones ITS 1 e ITS 2 del ADN ribosomal de los aislados de *Colletotrichum* fueron utilizadas para realizar la secuenciación. Utilizando los productos de PCR purificados con *MinElute PCR Purification kit* y se enviaron a secuenciar las regiones ITS (1 y 2). Las muestras de los aislados de *Colletotrichum* spp., Colle 2 y 5 se enviaron a secuenciar a *Macrogen*, Korea y los aislados Colle 1, 3 y 4, al *DNA Sequence and Synthesis Facility* en *Iowa State University*. El morfotipo 1 del cual se extrajo el ADN ribosomal y se amplificaron las regiones ITS 1 e ITS 2 de la misma manera que con los aislados de *Colletotrichum*, se envió al *DNA Sequence and Synthesis Facility* en *Iowa State University*. Las secuencias se alinearon utilizando el programa *BLAST 2 Sequences* y se editaron (*Nacional Center for Biotechnology Information, BLAST*).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio preliminar en siembra de gandul

En todas las muestras analizadas del aire, semillas y vainas se encontró a *C. gloeosporioides*. Las vainas presentaban lesiones características de la antracnosis de donde se pudo aislar a *C. gloeosporioides*. El porcentaje del *C. gloeosporioides* encontrado en la semilla fue de 1.96%. Durante los primeros dos muestreos aerobiológicos realizados no se recuperaron esporas de *C. gloeosporioides*, de igual manera, no se recuperó a *C. gloeosporioides* de las hojas, flores, ovario de las flores y hojas secas analizadas. Sin embargo, durante el último muestreo (6 de diciembre de 2003) se recuperó del aire hasta en un 38% (Tabla 1). El hongo se pudo recuperar durante los dos tiempos de exposición de platos. Este hallazgo indica que el inóculo del hongo estuvo disponible en el aire en el período de crecimiento del gandul en el cual se observaron lesiones de antracnosis en las vainas.

4.2 Exposición de platos Petri

De los platos Petri expuestos sobre la siembra comercial de gandul, se aislaron un total de 449 colonias y se identificaron 24 géneros, morfotipo 1 y HCER (Tabla 2). Los géneros *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Cladosporium*,

Tabla 1. Frecuencia de *C. gloeosporioides* en el aire de una siembra comercial de gandul, en la Estación Experimental Agrícola de Isabela, durante el muestreo preliminar realizado el 6 de diciembre de 2003.

Plato expuesto ¹	10 min ²	15 min ³
	Frecuencia	
1a	0.00	0.00
1b	0.00	0.00
1c	0.04	0.00
2a	0.09	0.20
2b	0.14	0.14
2c	0.00	0.18
3a	0.11	0.00
3b	0.03	0.06
3c	0.06	0.00
4a	0.14	0.10
4b	0.00	0.09
4c	0.23	0.20
5a	0.38	0.00
5b	0.00	0.02
5c	0.00	0.17

¹El número corresponde a cada estación de muestreo y la letra a cada plato con AA expuesto en esa estación.

²Frecuencia de *C. gloeosporioides* a los 10 minutos de exposición

³Frecuencia de *C. gloeosporioides* a los 15 minutos de exposición

Tabla 2. Géneros de hongos miceliales aislados y su frecuencia en el aire sobre la siembra de gandul comercial, cultivar I-8-3-1, durante los cuatro muestreos realizados.

Género	Frecuencia
<i>Fusarium</i>	0.203 ab ²
<i>Curvularia</i>	0.160 ab
<i>Alternaria</i>	0.107 bc
<i>Cladosporium</i>	0.091 bc
<i>Drechslera</i>	0.029 cd
<i>Nigrospora</i>	0.024 cde
<i>Trichoderma</i>	0.020 de
<i>Aspergillus</i>	0.018 cde
<i>Pithomyces</i>	0.018 cde
<i>Penicillium</i>	0.017de
<i>Pestalotia</i>	0.011 de
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0.009 de
<i>Aspergillus niger</i>	0.009 de
<i>Phoma</i>	0.009 de

Tabla 2. Continuación

Género	Frecuencia
<i>Eurotium</i>	0.007 de
<i>Mucor</i>	0.007 de
<i>Acremonium</i>	0.007 de
<i>Sirosporium</i>	0.007 de
<i>Rhizopus</i>	0.004 e
<i>Phomopsis</i>	0.004 de
<i>Aspergillus terreus</i>	0.002 e
<i>Paecilomyces</i>	0.002 e
<i>Spegazzinia</i>	0.002 de
<i>Passalora</i>	0.002 de
<i>Ulocladium</i>	0.002 de
<i>Sphaeropsis</i>	0.002 de
Morfotipo 1	0.002 de
HCER ¹	0.225 a

¹ Hongos carentes de estructuras de reproducción

² Diferencias significativas mediante análisis no paramétrico

Drechslera, *Aspergillus* y *Penicillium*, en orden descendente de incidencia, prevalecieron en todos los muestreos.

Los HCER se aislaron en todos los muestreos. Géneros saprófitos como *Nigrospora*, *Pithomyces*, *Sirosporium* y *Acremonium*, predominaron en tres de los cuatro muestreos pero con menor incidencia. Entre el segundo y tercer muestreo, se aislaron cuatro colonias de actinomicetos.

Durante los cuatro muestreos *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp. fueron los hongos de mayor incidencia. *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp. se aislaron de todos los muestreos presentando las incidencias más bajas en los primeros dos muestreos. Luego presentaron un ascenso considerable, con las incidencias más altas en el tercer y cuarto muestreo, después de *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp. Los HCER presentaron la frecuencia más alta en todos los muestreos (la frecuencia total de estos aislados es la obtenida luego de haber promovido su esporulación de distintas maneras).

En el primer muestreo, realizado antes de la producción de flores y en el segundo muestreo, durante la floración, *Fusarium* spp. y *Curvularia* spp. fueron los hongos de mayor incidencia (Tabla 3) (Figura 5 y Figura 6). Durante el tercer muestreo se recuperó la mayor diversidad de hongos (20 géneros). Los hongos recuperados con mayor frecuencia durante este muestreo, fueron *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp., seguidos de *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp (Tabla 3) (Figura 7). En el último muestreo los hongos de mayor incidencia fueron

Curvularia spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp (Tabla 3) (Figura 8).

En otra investigación realizada en la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz, al Sur de Puerto Rico se estudiaron los hongos asociados al cultivo de la cebolla, en el aire y el suelo (Vélez et al., 2004). Éstos encontraron en las muestras de aire que los aislados más frecuentes fueron *Aspergillus niger*, *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. Además se aislaron con menor incidencia *Phoma* spp., *Aspergillus* spp. y *Curvularia* spp. En todos los muestreos *Fusarium* spp. presentó el porcentaje mayor de colonias aisladas (Vélez et al., 2004). De igual manera, el género más frecuente en nuestra investigación lo fue *Fusarium*. En contraste con la investigación realizada en la cebolla, en el presente estudio se aisló *A. niger* con una baja frecuencia y *Curvularia* spp. se aisló con alta frecuencia en todos los muestreos. Estos datos demuestran que todos los géneros aislados del aire en el presente estudio concuerdan con la investigación realizada por Vélez et al., (2004).

Entre los años 1980-1981, se realizó un estudio en siembras de gandul en cuatro pueblos de Puerto Rico. Se muestrearon semillas al azar y se aislaron los géneros *Botryodiplodia*, *Fusarium*, *Phomopsis*, *Cladosporium* y *Alternaria*. En semillas en almacenaje, aumentó la incidencia de los géneros *Rhizopus*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Hepperly y Rodríguez, 1984).

Tabla 3. Géneros de hongos miceliales aislados y su frecuencia en el aire sobre la siembra de gandul comercial, cultivar I-8-3-1, durante cada muestreo realizado.

Género	Frecuencia			
	M1 ¹	M2 ²	M3 ³	M4 ⁴
<i>Fusarium</i>	0.243	0.319	0.102	0.190
<i>Curvularia</i>	0.268	0.128	0.126	0.220
<i>Alternaria</i>	0.073	0.007	0.157	0.180
<i>Cladosporium</i>	0.024	0.007	0.151	0.140
<i>Drechslera</i>	0.073	0.007	0.030	0.004
<i>Nigrospora</i>	0.024	0	0.042	0.003
<i>Trichoderma</i>	0	0.042	0.018	0
<i>Aspergillus</i>	0.024	0.035	0.006	0.001
<i>Pithomyces</i>	0.024	0.014	0.024	0
<i>Penicillium</i>	0.073	0.007	0.012	0.001
<i>Pestalotia</i>	0	0.021	0.012	0
<i>Colletotrichum</i>				
<i>gloeosporioides</i>	0.049	0	0.006	0.001
<i>Aspergillus niger</i>	0	0.021	0	0.001
<i>Phoma</i>	0	0.014	0.012	0

Tabla 3. Continuación

Género	Frecuencia			
	M1 ¹	M2 ²	M3 ³	M4 ⁴
<i>Eurotium</i>	0	0.020	0	0
<i>Mucor</i>	0	0.021	0	0
<i>Acremonium</i>	0	0.007	0.006	0.001
<i>Sirosporium</i>	0	0	0.006	0.002
<i>Rhizopus</i>	0.049	0	0	0
<i>Phomopsis</i>	0	0	0.012	0
<i>Aspergillus terreus</i>	0.024	0	0	0
<i>Paecilomyces</i>	0.024	0	0	0
<i>Spegazzinia</i>	0	0	0.006	0
<i>Passalora</i>	0	0	0.006	0
<i>Ulocladium</i>	0	0	0.006	0
<i>Sphaeropsis</i>	0	0	0.006	0
Morfotipo 1	0	0	0.006	0
HCER ⁵	0.024	0.326	0.247	0.130

¹Frecuencia de géneros de hongos aislados durante el primer muestreo

²Frecuencia de géneros de hongos aislados durante el segundo muestreo

³Frecuencia de géneros de hongos aislados durante el tercer muestreo

⁴Frecuencia de géneros de hongos aislados durante el cuarto muestreo

⁵Hongos carentes de estructuras de reproducción

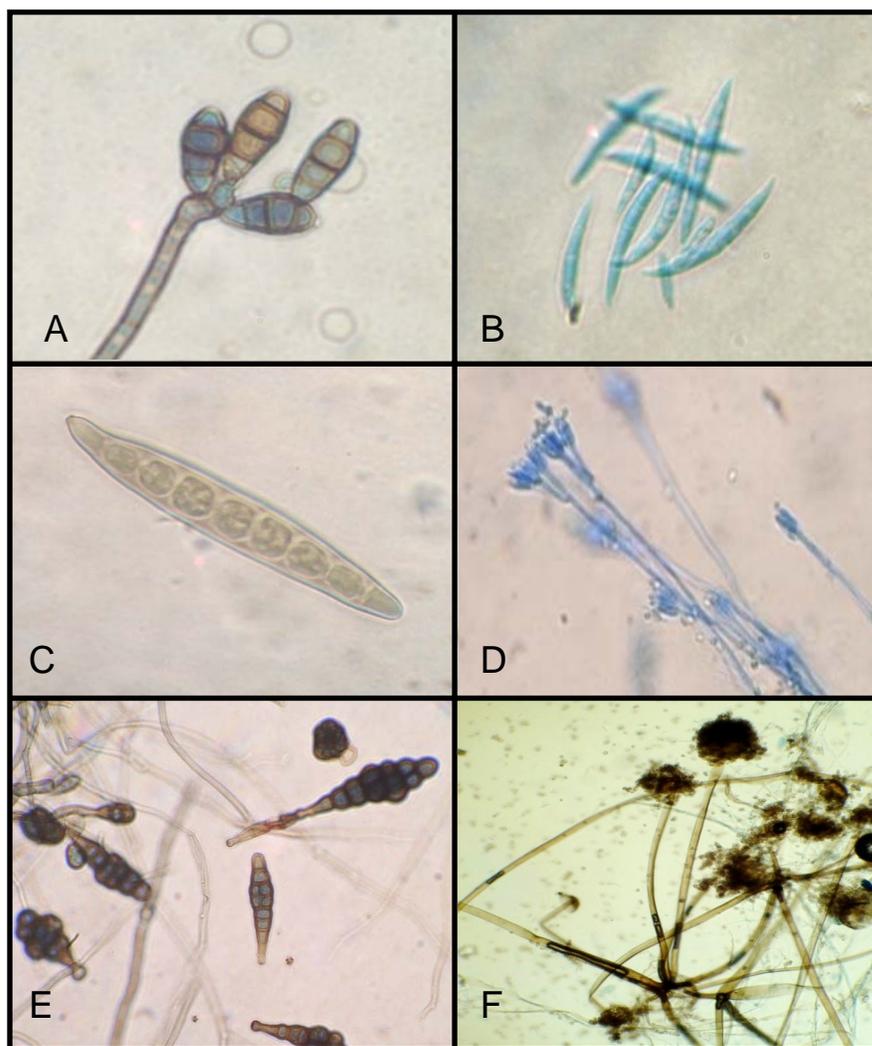


Figura 5. Hongos miceliales más frecuentes recuperados durante el primer muestreo, (A) *Curvularia* spp., (B) *Fusarium* spp., (C) *Drechslera* spp., (D) *Penicillium* spp., (E) *Alternaria* spp. y (F) *Rhizopus* sp.

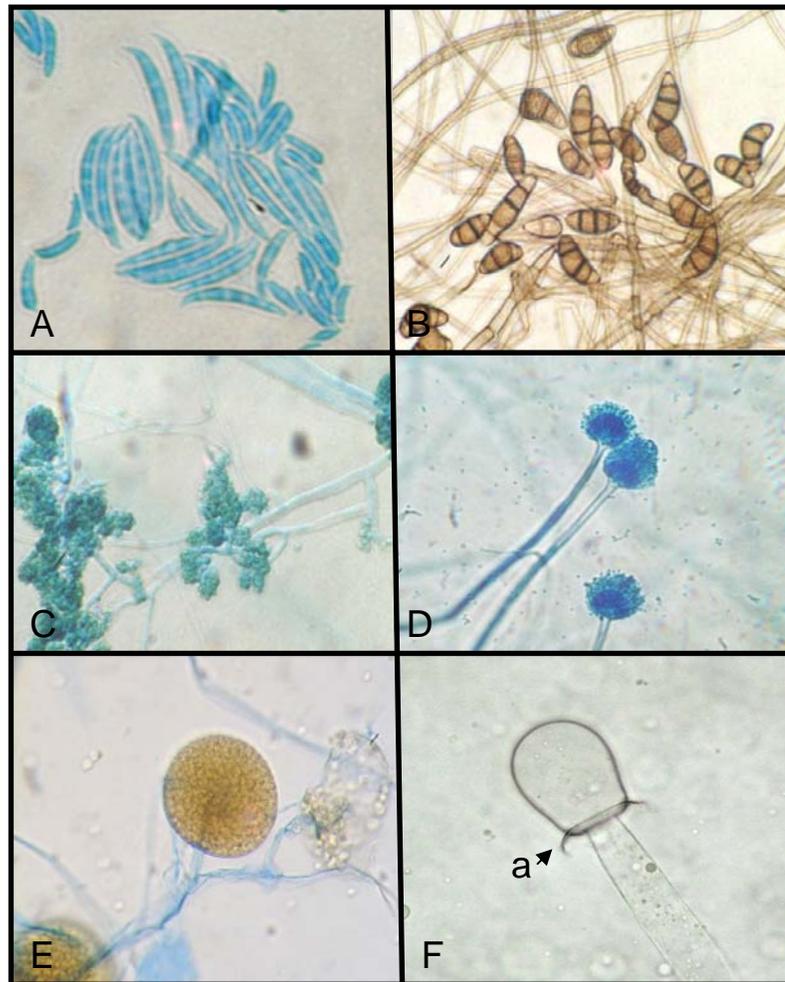


Figura 6. Hongos miceliales más frecuentes recuperados durante el segundo muestreo, (A) *Fusarium* spp, (B) *Curvularia* spp, (C) *Trichoderma* spp., (D) *Aspergillus* spp., (E) *Mucor* spp. y (F) columela de *Mucor*, (a) collarete.

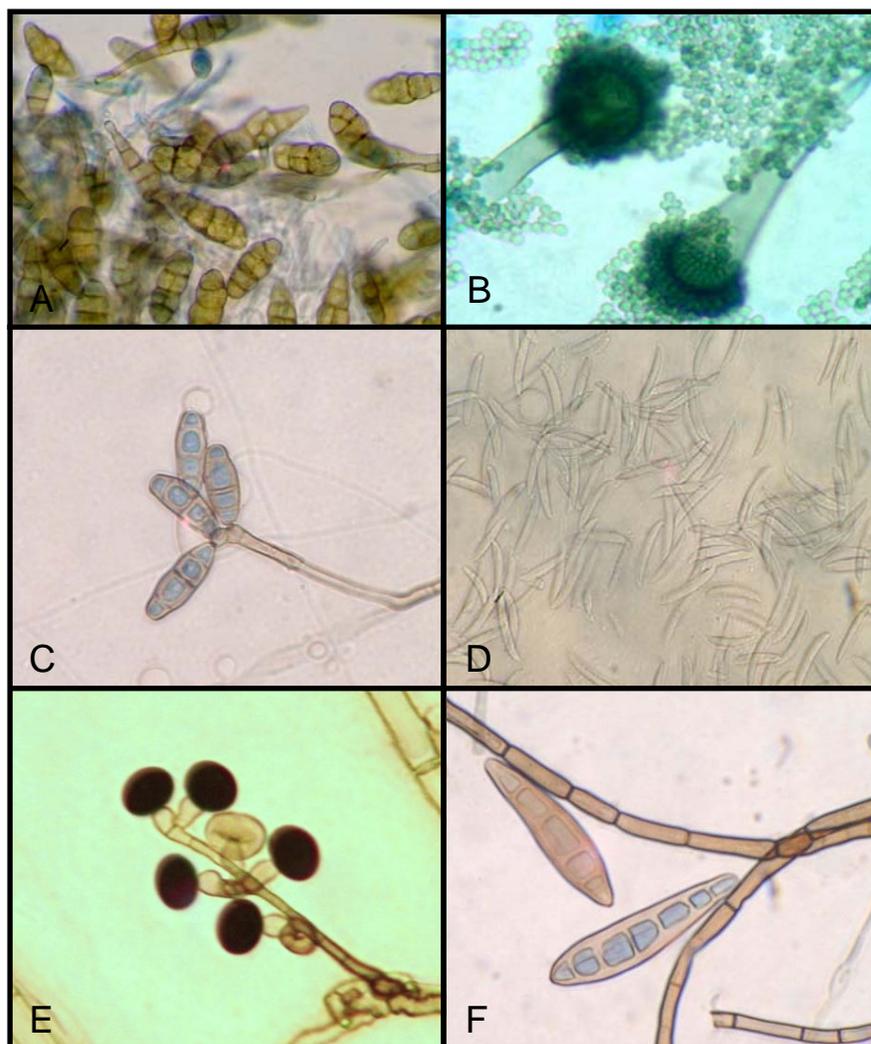


Figura 7. Hongos miceliales más frecuentes recuperados durante el tercer muestreo, (A) *Alternaria* spp., (B) *Aspergillus* spp., (C) *Curvularia* spp., (D) *Fusarium* spp. (E) *Nigrospora* spp. y (F) *Drechslera* spp.

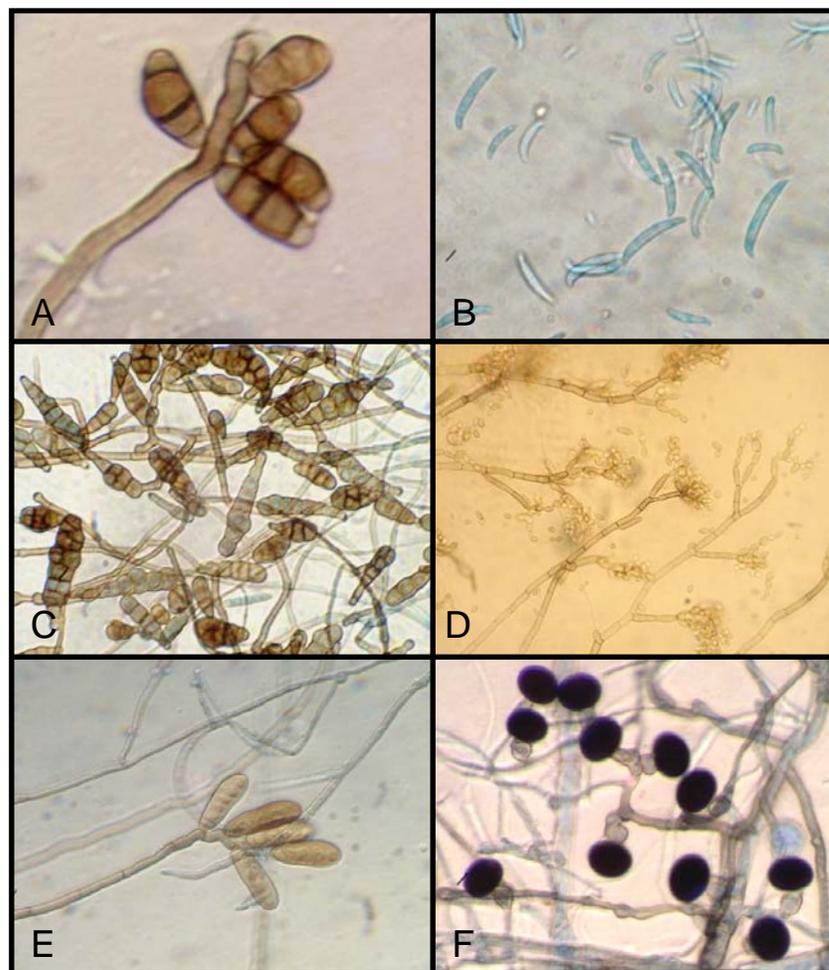


Figura 8. Hongos miceliales más frecuentes recuperados durante el cuarto muestreo, (A) *Curvularia* spp., (B) *Fusarium* spp., (C) *Alternaria* spp., (D) *Cladosporium* spp. (E) *Drechslera* spp. y (F) *Nigrospora* spp.

Los géneros reportados, concuerdan con los encontrados en el presente estudio aerobiológico, con la excepción de *Botryodiplodia*.

Afzal y Mehdi estudiaron la micoflora aérea de la ciudad de Karachi en Pakistán, encontrando los mismos géneros reportados en nuestro estudio: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Ulocladium*. Todos estos hongos con excepción de *Ulocladium* spp. son descritos por Lozada et al., (1998), como contaminantes ambientales comunes, por lo que pueden estar presentes comúnmente en el aire en distintas frecuencias dependiendo de la localidad y otros factores.

A pesar de que los hongos recuperados pueden encontrarse en el aire comúnmente, muchos de éstos son de importancia fitopatológica. *Phoma* puede causar el cancro del gandul y fue el causante de una seria epidemia en el gandul en PR en el 1954, afectando el tallo y las ramas (Álvarez, 1960). En la India, *Fusarium udum*, causante de la marchitez del follaje del gandul, es una de las enfermedades de mayor importancia en el gandul, causando pérdidas de 37 millones de dólares anualmente (Nene, 1988). Kaiser (1981) reportó que *Alternaria tenuissima*, afecta las semillas del gandul, *C. gloeosporioides* afecta semillas, tallo y vainas, *F. semitectum* afecta las semillas y *Phomopsis* sp. afecta las semillas y puede afectar las vainas. *A. alternata* puede causar el tizón del gandul, *Cladosporium oxysporum* causa el tizón de la hoja y *C. cladosporioides* la mancha de la hoja del gandul, *Fusarium pallidroseum* el tizón del gandul, *F.*

avenaceum y *F. equiseti* la pudrición de la semilla (Nene y Sheila, 1996). Algunos de los géneros encontradas en nuestro estudio también son de importancia fitopatológica en otros cultivos.

4.2.1 Características morfológicas del Morfotipo 1

El morfotipo 1 fue aislado del tercer muestreo durante el primer período de exposición, a una altura de 140 cm. Éste presentó características macroscópicas parecidas a las de *C. gloeosporioides*. En AA y APD su colonia es de apariencia glabra (micelio sumergido en el medio de cultivo), caracterizado por masas de esporas mucilaginosas de color anaranjado. Se observaron cuerpos fructíferos negros en el medio del cultivo. Microscópicamente presenta esporas hialinas fusiformes, en su mayoría de forma curva, con uno de los extremos más finos, con 3 a 18 septas. Sus esporas tienen una medida promedio de $74.5 \times 2.4 \mu$ y presentan gran variabilidad de tamaño y forma. Además, se observaron microconidias de formas curvas y rectas, con una medida de $20.3 \times 2.8 \mu$, con 3 a 8 septas (Figura 9).

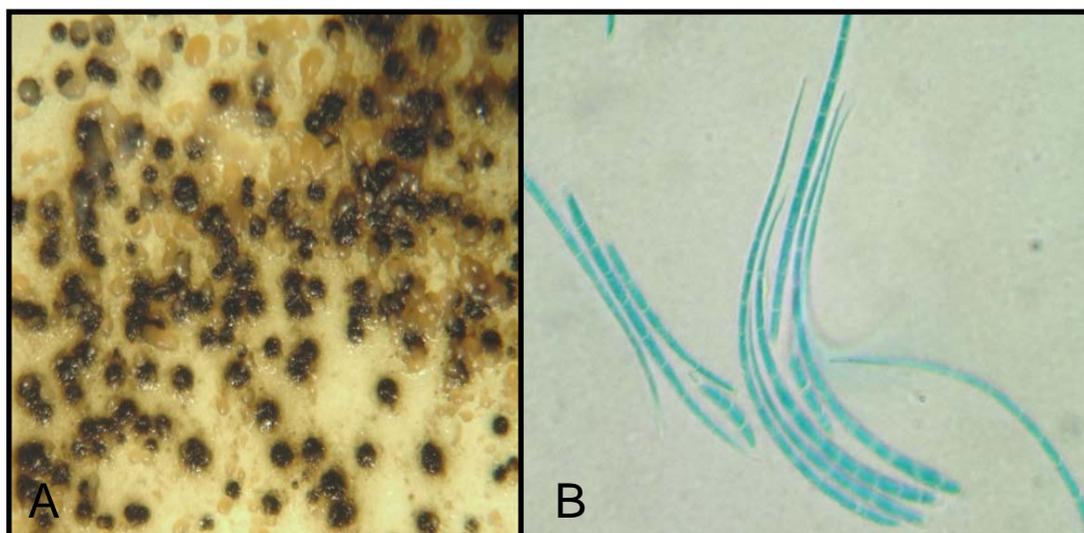


Figura 9. Morfotipo 1, (A) Cuerpos fructíferos y masas de esporas en agar de avena, (B) esporas.

El análisis de regresión múltiple, no indica correlación entre el total de aislados y las condiciones climáticas examinadas para el segundo, tercer y cuarto muestreo (velocidad del viento, temperatura, humedad relativa y punto de rocío). También, se observó correlación entre el número total de aislados y la presión barométrica ($P \leq 0.1$). Se determinó que no hay correlación entre las condiciones ambientales estudiadas y algunos hongos aislados en mayor frecuencia (*Fusarium*, *Curvularia* y HCER), utilizando un análisis de regresión múltiple ($P \leq 0.1$). Sin embargo, si hubo correlación entre *Cladosporium* y la temperatura, la humedad relativa y el punto de rocío. *Alternaria* también presentó una correlación con la temperatura, humedad relativa, punto de rocío y la presión barométrica. Fernando et al., (2000), demostraron que la germinación de *Colletotrichum acutatum* está relacionada a la humedad relativa alta, la temperatura y el agua libre disponible (a_w). De igual manera, humedad relativa y temperatura están relacionadas al total de aislados de *Alternaria* y *Cladosporium*. En el presente estudio *Fusarium*, *Curvularia* y HCER no mostraron relación con los factores ambientales estudiados. En este estudio, varios géneros están influenciados por determinados factores ambientales y otros no demostraron relación con los factores estudiados.

Harrison et al., (1994) afirman que el crecimiento, germinación y sobrevivencia de un hongo en una hoja está asociado a la cantidad de humedad disponible en el aire (Talley et al., 2002). La formación de rocío sobre la hoja es

crítico para la germinación de muchos hongos patógenos (Talley et al., 2002). Se ha documentado que la temperatura y la humedad relativa son factores claves para el desarrollo de la antracnosis (Wharton, 2001), pero en el presente estudio no se estableció una correlación de *C. gloeosporioides* con estos factores, ni con otros factores estudiados, debido a que la frecuencia de recuperación de este hongo fue muy baja.

4.2.2 Efecto de la altura de exposición de platos, períodos de exposición, cada muestreo y la cantidad de aislados de cada especie sobre los hongos aislados (totales o más frecuentes)

Para el primer muestreo, se realizó un análisis no paramétrico mediante *proc rank* y se determinó que no hay relación entre el total de hongos aislados, la altura de exposición de platos, en los tres períodos de tiempo y entre la cantidad de aislados de cada especie ($P \leq 0.05$). En el segundo, tercero y cuarto muestreo, mediante análisis no paramétrico se encontró que hay relación entre la altura de exposición de platos y la cantidad de aislados de cada especie, y el total de hongos aislados, pero no se encontraron diferencias significativas entre el total de hongos aislados durante los períodos de exposición. Mediante un análisis de varianza con los hongos aislados con más frecuencia (*Fusarium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Alternaria* y HCER), se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de aislados de *Fusarium*, *Cladosporium* y *Alternaria* entre cada muestreo ($P \leq 0.05$). Además, se determinó que no hay relación entre la

cantidad géneros de hongos, la altura de exposición de platos, entre muestreos y entre períodos de exposición, y los hongos aislados con mayor frecuencia ($P \leq 0.05$). Las diferencias entre géneros son evidentes ya que algunos mostraron un total bajo para un muestreo, sin embargo, incrementaron de manera considerable en otro muestreo.

Maldonado-Ramírez et al., (2005) recuperaron esporas viables de *Gibberella zeae*, con un vehículo piloteado por control remoto y no encontraron diferencias significativas entre la cantidad de colonias y diferentes períodos del día. En nuestro estudio, en ninguno de los cuatro muestreos realizados se encontró relación entre la cantidad de aislados y los diferentes períodos de exposición estudiados. Aylor y Anagnostakis (1991) demostraron que ocurre un rápido descenso en la concentración de ascosporas de *Venturia inaequalis* al aumentar la altura sobre la tierra. Ésto fue explicado por un cambio rápido en la velocidad del viento y un movimiento turbulento del viento sobre la tierra. En el estudio de Aylor y Anagnostakis (1991) se relacionaron diferentes factores asociados al comportamiento de *V. inaequalis*. En el presente estudio solo se relacionaron los diferentes factores meteorológicos con el total de hongos y es probable que al comparar cada género de hongo con cada factor ambiental se observe alguna correlación.

4.2.3 Correlación entre el total de hongos aislados y el tipo de nube sobre la siembra de gandul

No se encontró relación, entre el tipo de nubes sobre la siembra de gandul y el total de hongos aislados en los cuatro muestreos realizados. Estos resultados difieren del estudio de Maldonado-Ramírez et al., (2005) quienes encontraron una mayor abundancia de esporas viables de *Gibberella zeae* en días nublados. Posiblemente la limitación en el número de datos obtenidos, sobre la cobertura y tipo de nubes en nuestra investigación no permitió establecer una relación con el total de hongos aislados.

4.3 Aerobiología de *C. gloeosporioides*

En el primer muestreo se recuperó a *C. gloeosporioides* (Colle 1 y 2) a alturas de 94 y 180 cm del suelo, con una frecuencia de 0.049. Sin embargo, en el segundo muestreo no se recuperaron colonias de esta especie. Durante el tercer muestreo se aisló *C. gloeosporioides* (Colle 4) con una frecuencia de 0.006, en el tercer período de muestreo a 140 cm y en el último muestreo se recuperó el aislado de *C. gloeosporioides*, Colle 5, con una frecuencia de 0.001, a una altura de 290 cm. La presencia de este patógeno, aunque en bajas frecuencias, durante todas las etapas de este estudio es indicativo de que hay inóculo del patógeno disponible para infectar el cultivo. En el estudio preliminar realizado en la siembra de gandul, la frecuencia del inóculo disponible en el aire

sobre la siembra fue suficiente para infectar las vainas y granos. Esta información debe tomarse en consideración durante las diferentes fases del manejo de plagas. La disponibilidad de inóculo aerotransportable no sólo es importante para la siembra estudiada, sino también para siembras adyacentes de gandul y otros cultivos susceptibles al patógeno.

Kaiser (1981) señala a *Colletotrichum cajani* (sinónimo *C. gloeosporioides*) como un hongo que afecta las hojas, vainas y semillas del gandul, en las áreas tropicales y subtropicales de Puerto Rico y Estados Unidos, incluyendo, Florida, Hawaii y Texas. En el estudio preliminar en la siembra de gandul de la línea I-8-3-1, en la EEA de Isabela, se recuperó a *Colletotrichum* sp. con una frecuencia de hasta 0.38, en muestras del aire. También se observaron lesiones de antracnosis en las vainas, de donde se pudo aislar el hongo. No se observaron lesiones en otros órganos del gandul. Hepperly y Rodríguez (1984) en un estudio con siembras de gandul en PR, encontraron a *C. gloeosporioides* con una razón de recuperación no mayor de 15% de las semillas.

4.4 Exposición de laminillas con superficie adhesiva

En el segundo muestreo donde se realizó la primera exposición de laminillas sólo se observó una espora de *Drechslera* en el último período de muestreo (6:40-6:50 pm) a una altura de 140 cm. En el tercer muestreo no se recuperaron esporas, pero se observó polen no identificado en 11 de las laminillas expuestas.

El polen se recuperó a una altura de 140 y a 290 cm. En las laminillas expuestas en el último muestreo no se recuperaron esporas y sólo se observó polen en el segundo período (2:54-3:04 pm) de muestreo a 140 cm de altura.

En un estudio realizado por Arseniuk et al., (1998) utilizaron el método de exposición de laminilla para la recuperación de esporas aéreas de *Phaeosphaeria* spp. y *Stagonospora* spp. Las esporas de estos hongos patógenos al trigo se depositaron en densidades diferentes en las laminillas. En el presente estudio sólo se recuperó una espora de *Drechslera* y granos de polen. Probablemente, la pobre recuperación de especies de hongos se debió a la posición en la cual se colocó la laminilla. En estudios como los de Arseniuk, la recuperación de esporas ocurre por deposición de las mismas sobre una laminilla en posición horizontal. En el presente estudio, se utilizaron atrapadores en posición vertical para recuperar las esporas disponibles en el aire sobre la siembra, proveyendo la oportunidad de que la recuperación de esporas ocurriera por impacto y no por sedimentación o gravedad.

4.5 Evaluación del tejido vegetal y de las pupas de la mosca *Melanagromyza obtusa*

De las hojas de gandul evaluadas se recuperaron solamente los géneros *Drechslera* y *Nigrospora* y en las hojas de la yerba guinea se aisló una colonia de *C. gloeosporioides* (Colle 3), *Fusarium* y un HCER con micelio algodonoso

rojo y verde. De los pétalos de las flores se obtuvieron cinco colonias diferentes de *Alternaria*, una de *Cladosporium* y un HCER. De los capullos se aisló *Fusarium*, *Alternaria*, *Nigrospora*, *Curvularia* y un hongo carente de estructuras de reproducción. En los estudios preliminares realizados con flores se recuperó a *Curvularia* spp., el cual fue recuperado frecuentemente en este estudio. Esto puede sugerir que la distribución de esta micoflora responde a variaciones temporales.

En el muestreo de las pupas de *M. obtusa*, se obtuvieron 10 platos sin crecimiento de colonias y en los restantes cinco platos se encontraron tres colonias de *Alternaria* spp., una de *Aspergillus* spp. y una de *Cladosporium* spp. Sin embargo, no se aislaron colonias de *C. gloeosporioides*. Agrios (1985) menciona que hay insectos acarreadores de esporas de hongos y que muchos de estos sobreviven durante largos períodos de tiempo, lo cual propicia la diseminación de patógenos. Algunos hongos producen masas de esporas mucilaginosas que les permiten adherirse entre sí y a otros organismos. Estas esporas pueden estar rodeadas por secreciones azucaradas, las cuales atraen los a insectos (Webster, 1980). En las pupas de la mosca *M. obtusa* se pudieron encontrar géneros de hongos que también fueron aislados del aire, pero no se pudo asociar este insecto con la diseminación de *C. gloeosporioides*. Evaluaciones sobre la micoflora en otras etapas del ciclo de vida de este y otros

insectos podrían proveer información sobre la diseminación de las esporas de este hongo por insectos.

4.6 Pruebas de patogenicidad de cultivos de *C. gloeosporioides*.

En las pruebas de patogenicidad realizadas con los cultivos monospóricos de *C. gloeosporioides* se determinó que el porcentaje de severidad en las vainas de gandul varió de 78 a 100% (Tabla 4) (Figura 10). Según la escala de evaluación de Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987), las vainas se consideran susceptibles cuando presentan daño del 40 al 100%. Debido al porcentaje de severidad observado en las vainas evaluadas, éstas se consideran susceptibles a la antracnosis. El porcentaje de severidad es indicativo de que todos los aislados recuperados son patogénicos al gandul. Se observaron masas de esporas anaranjadas sobre las vainas y lesiones hundidas color marrón de borde marrón oscuro a los cinco días. A los siete días se observaron lesiones fusionadas, representativo de la pudrición parcial o total de las vainas. Aunque el aislado Colle 1 causó la mayor severidad de la antracnosis con 100% y Colle 5 la menor severidad promedio de 78%, el análisis de varianza determinó que no existen diferencias significativas entre la severidad causada por los aislados evaluados en las pruebas de patogenicidad ($P \leq 0.05$). Al comparar la severidad

Tabla 4. Porcentaje de severidad del daño causado por *C. gloeosporioides* en la vaina de gandul a los cinco y siete días después de inoculadas.

Aislado	Severidad ¹ %					Promedio ³ %	Severidad ¹ %					Promedio ³ %
	5 ddi ²						7 ddi ²					
Colle 1	80	30	100	70	60	68	100	100	100	100	100	100
Colle 2	50	80	30	60	10	46	100	100	100	100	80	96
Colle 3	70	60	50	80	10	54	80	100	100	100	20	80
Colle 4	20	15	100	20	10	33	40	100	100	100	100	88
Colle 5	100	20	0	0	0	24	100	100	100	10	80	78

¹ escala de evaluación de severidad, Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987)

² ddi= días después de inoculado

³ promedio de cinco vainas inoculadas

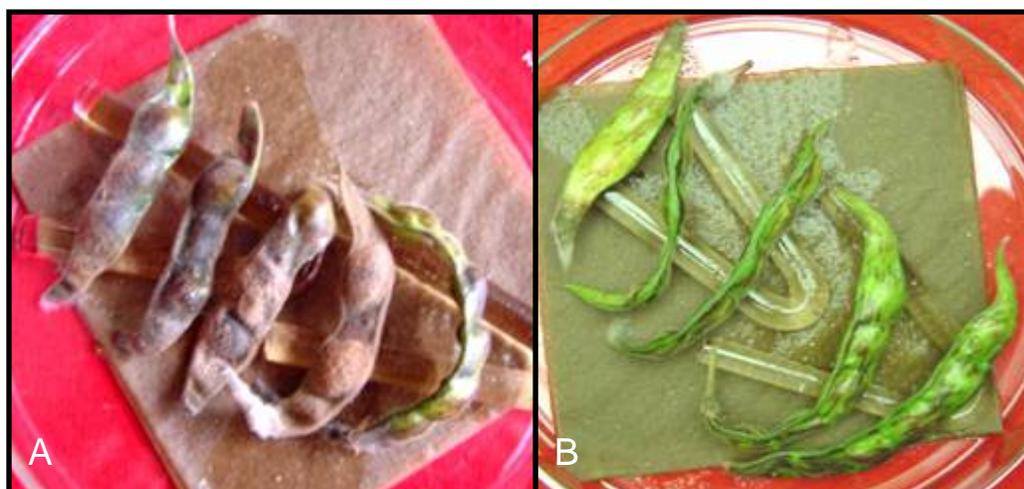


Figura 10. Prueba de patogenicidad *in vitro* en vainas de gandul, cultivar I-8-3-1, utilizando cámaras húmedas, (A) vainas de gandul inoculadas con *C. gloeosporioides* y (B) vainas de gandul control (no inoculadas).

de la infección a los cinco y a los siete días, se determinó que no hay diferencias significativas entre los tiempos evaluados para Colle 1 y 3. Para los aislados Colle 2, 4, 5, sí hubo diferencias significativas, siendo la severidad de la infección significativamente más alta en el segundo tiempo ($P \leq 0.05$).

En estudios realizados por Echávez y Alameda (1998), se evaluaron vainas de gandul de cultivares afectados por antracnosis y se determinó que no hubo diferencias significativas en la severidad de la infección. La antracnosis fue significativamente mayor en las siembras del mes de mayo que en las de los meses de junio y julio. Algunos de los cultivares estudiados resultaron tener una resistencia intermedia siendo el cultivar I-8-2 susceptible. Al igual que el cultivar I-8-2, el cultivar de gandul 1-8-3-1 es susceptible a la antracnosis y los aislados no mostraron diferencias significativas en la severidad Echávez y Alameda (1998). Algunas de las vainas estudiadas en el presente estudio mostraron 100% de severidad de daño en siete días. Freeman et al., (2000) realizaron pruebas de patogenicidad con *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* en anémón (*Anemone coronaria* L.) y fresa (*Fragaria vesca* L.). Estos aislados mostraron una severidad que causó la mortalidad de ambas plantas en dos semanas. En las pruebas de patogenicidad realizadas con 35 aislados de *C. acutatum* en fresas, Denoyes-Rothan et al., (2003) encontraron que todos los aislados causaron al menos una lesión, considerándose todos los aislados patogénicos a la fresa. También observaron que los aislados colectados en los

años 1988 al 1994 fueron más virulentos que los aislados a principios del 1980. Al igual que en el presente estudio, los aislados de *C. gloeosporioides* fueron patogénicos al cultivar de gandul estudiado.

4.7 Características morfológicas macroscópicas de los aislados en AA

Los aislados de *C. gloeosporioides* presentan diferencias morfológicas macroscópicas, caracterizados por masas de esporas mucilaginosas con tonalidades distintivas de anaranjado para cada aislado. Colle 1 y Colle 2, aislados del aire, mostraron abundancia de masas de esporas anaranjadas, con micelio algodonoso blanco y escaso. Sin embargo, Colle 2 produjo masas de esporas más abundantes y de color anaranjado más intenso. Colle 3 aislado de yerba guinea, presentó micelio algodonoso blanco poco abundante y menor cantidad de masas de esporas, de color menos intenso que Colle 1 y 2. Colle 4 presentó micelio algodonoso gris claro, más abundante que todos los aislados, con masas de esporas anaranjadas-marrón claro predominantes en el lugar de inoculación. El micelio de Colle 5 era color gris con masas de esporas en menor cantidad que en Colle 1, 2 y 3 y de color anaranjado claro- marrón claro. La identificación de los aislados se basó en la clave taxonómica de Sutton (1980).

Von Arx (1970) describe a *C. gloeosporioides* macroscópicamente con masas de esporas rojizas a rosadas en forma de gotas viscosas. Sutton (1980)

señala que existe gran variabilidad morfológica para *C. gloeosporioides*. En un estudio realizado por Davis et al. (1992) se compararon las características del micelio, estructuras de reproducción y la apariencia de la colonia en aislados de *Colletotrichum* de *Stylosanthes* spp. Se observó que en todos los aislados comparados no hubo dos aislados que mostraran características idénticas para todas las características. Las características miceliales fueron muy variables, por lo que no fueron útiles para agrupar las especies. Esto es indicativo de que las diferencias morfológicas macroscópicas son distintivas de *C. gloeosporioides*, lo cual compara con el presente estudio.

4.8 Preparación de cámaras húmedas para la formación de apresorios y esporas de *C. gloeosporioides in vitro*

Se observaron apresorios de color marrón claro a marrón oscuro, con variaciones en su morfología (Figura 11). Estos presentaron medidas promedio de 11.46 x 5.99 μ . Según Sutton (1980) los apresorios de *C. gloeosporioides* presentan una medida de 6-10 x 4-12 μ . El largo de los apresorios de los aislados estudiados resultó más largo y el ancho está dentro del rango establecido por Sutton.

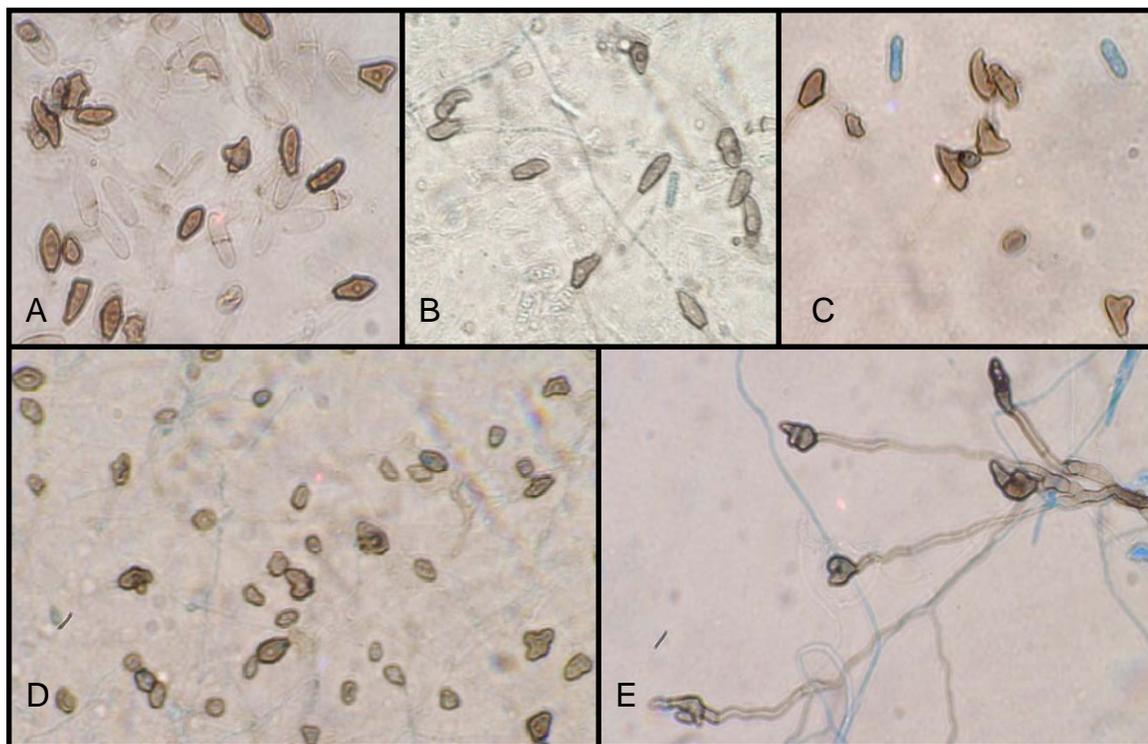


Figura 11. Apresorios de los aislados de *C. gloeosporioides*, (A) Colle 1, (B) Colle 2, (C) Colle 3, (D) Colle 4 y (E) Colle 5, donde se observan diferencias morfológicas microscópicas. Los apresorios de cada aislado son de color marrón, de formas variables desde ovales, irregulares a lobulados.

En la preparaciones permanentes de laminillas obtenidas de las cámaras húmedas se observaron esporas hialinas, cilíndricas de bordes redondeados, con una medida promedio de 13.15 x 3.04 μ . Las medidas de las conidias documentadas por Sutton tienen un rango de 9-24 x 3-4.5 μ , similares a las observadas en los aislados recuperados.

Además, se pudieron observar setas lisas en el acérvulo color marrón (Figura 12). En agar de agua se pudo observar el estado teleomorfo de *C. gloeosporioides*, *Glomerella cingulata*. El peritecio de color marrón oscuro contiene ascas hialinas con ascosporas biseriadas, cilíndricas e hialinas (Figura 13).

4.9 Micrografías de esporas y apresorios de *C. gloeosporioides* observadas a través de un MER

Utilizando el microscopio electrónico de rastreo se pudo observar la superficie de las vainas de gandul infectadas con *C. gloeosporioides*. Se observaron esporas, apresorios sobre la vaina y lesiones de donde salían las esporas rompiendo el tejido para formar los acérvulos (Figuras 15-18).

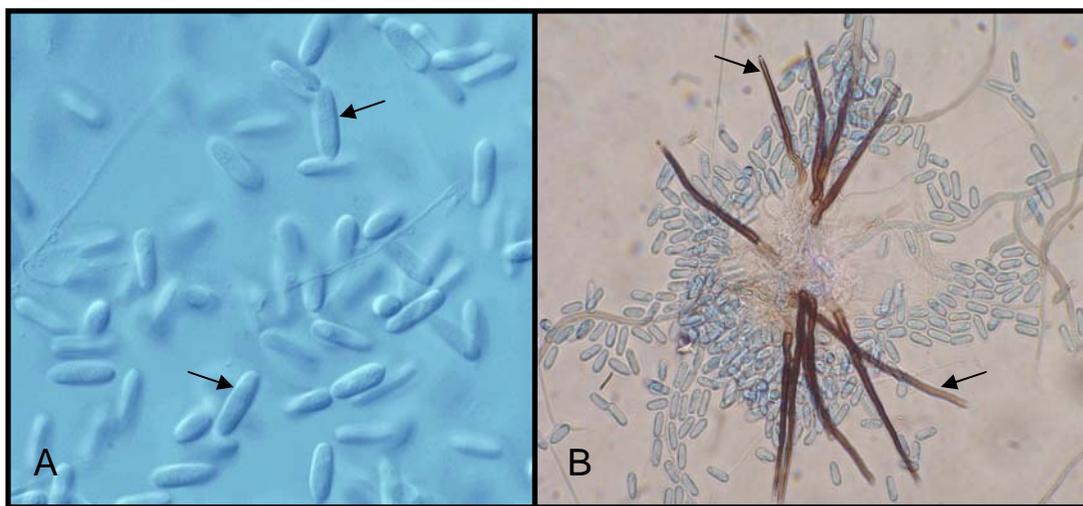


Figura 12. (A) Conidios de *C. gloeosporioides* bajo microscopio Nomarski y (B) setas observadas bajo microscopio de luz.



Figura 13. (A) Peritecio de *Glomerella cingulata*, estado teleomorfo de *C. gloeosporioides* y (B) ascas y ascosporas formados en medio de agar agua.

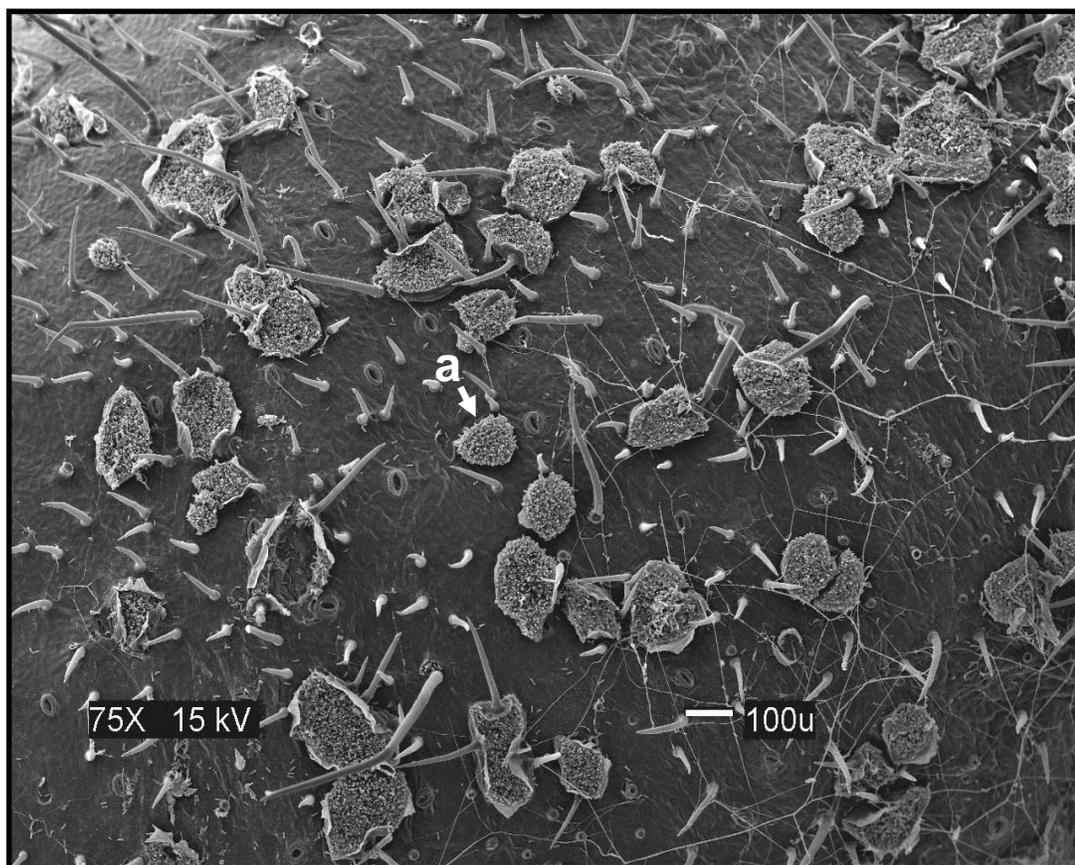


Figura 14. Vista la superficie de una vaina de gandul infectada con *C. gloeosporioides* (Colle 2), (a) lesión.

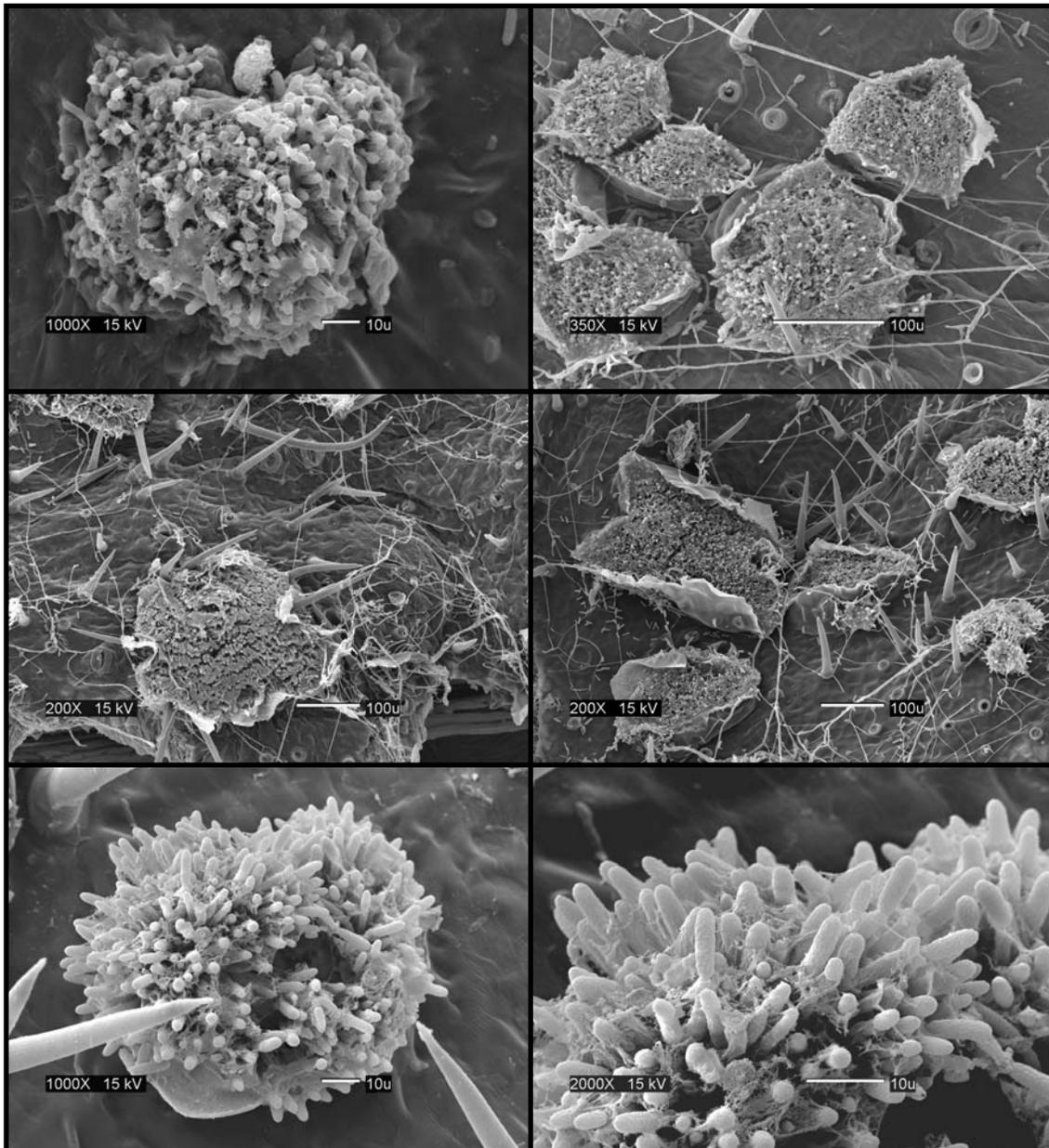


Figura 15. (A-E) Acérvulos de *C. gloeosporioides* (Colle 2) sobre vainas de gandul infectadas y (F) acercamiento de las esporas del acérvulo.

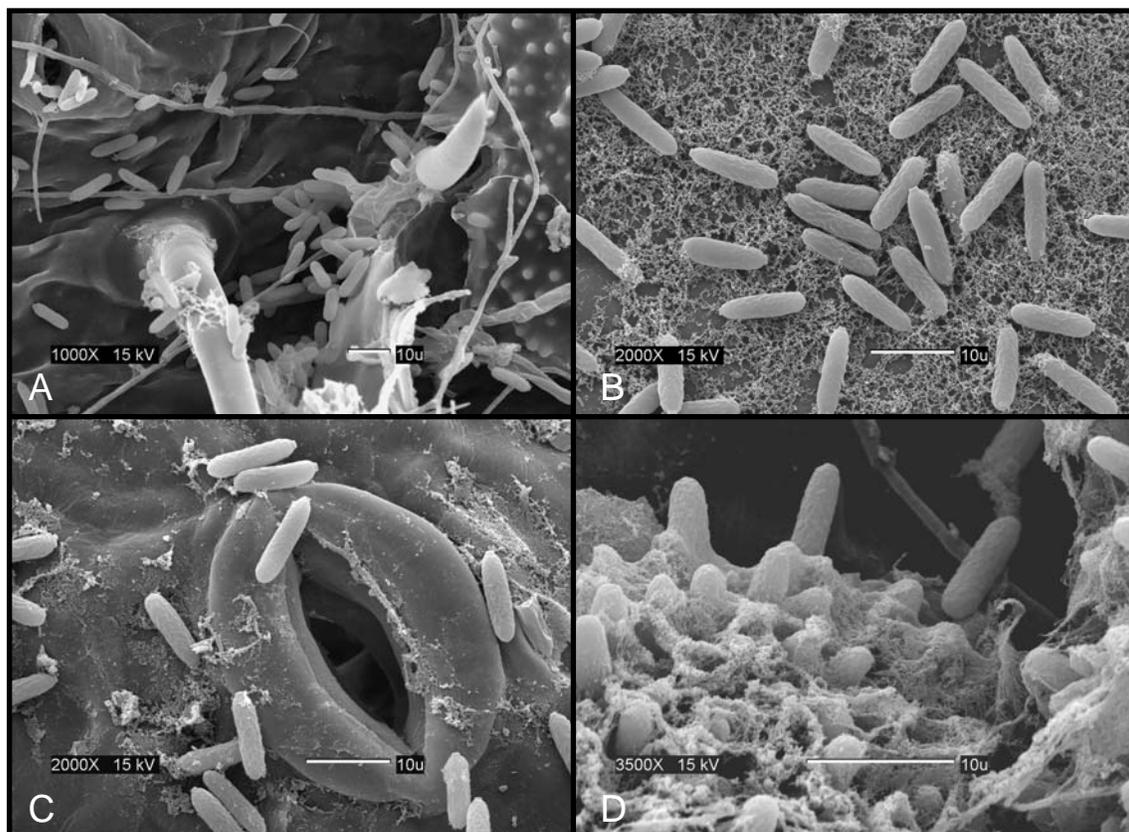


Figura 16. (A-B) Esporas de *C. gloeosporioides* (Colle 2) sobre el tejido de vainas de gandul, (C) esporas localizadas cerca del estoma de la vaina y (D) esporas adheridas por sustancia mucilaginosa producida por el hongo.

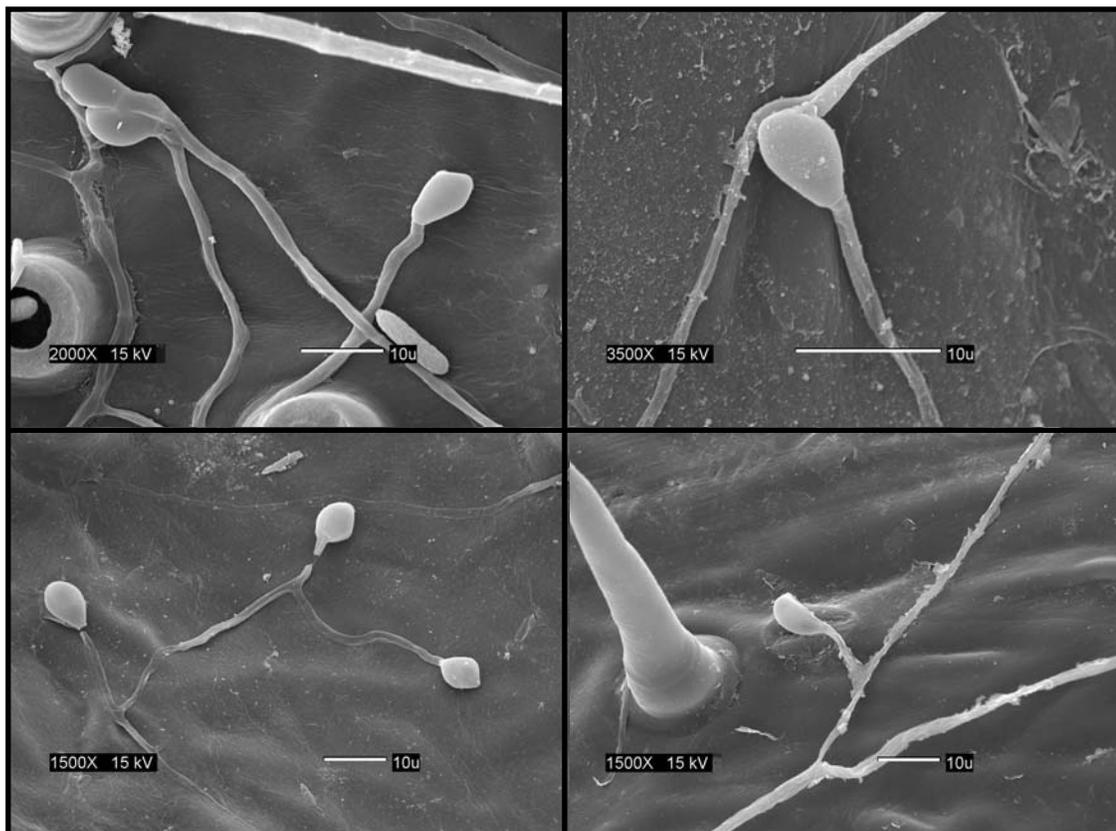


Figura 17. Apresorios de *C. gloeosporioides* (Colle 2) sobre el tejido de vainas de gandul.

4.10 Extracción del ADN de *C. gloeosporioides*

Como herramienta para la identificación de *Colletotrichum* se extrajo el ADN ribosomal (rDNA) y se obtuvieron productos de extracción para los cinco aislados de *Colletotrichum*. Las concentraciones del ADN fluctuaron entre 18.7 y 60 µg/mL.

4.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de aislados de *C. gloeosporioides*

La amplificación por PCR de las regiones ITS 1 e ITS 2, utilizando los *primers* ITS 1 e ITS 4, produjeron bandas un peso molecular de aproximadamente 600 pb para los cinco aislados de *C. gloeosporioides* y para la cepa certificada por CABI Bioscience (control positivo). El control negativo no presentó banda. Los productos de la amplificación de ADN por PCR se documentan en la Figura 18. Denoyes-Rothan et al., (2003) amplificaron el ADN ribosomal con PCR, utilizando los *primers* ITS 1 e ITS 4 y se produjeron bandas de aproximadamente 560 pb para todos los aislados de *C. gloeosporioides*, lo que concuerda con el peso molecular aproximado de la banda obtenida para los aislados del presente estudio.

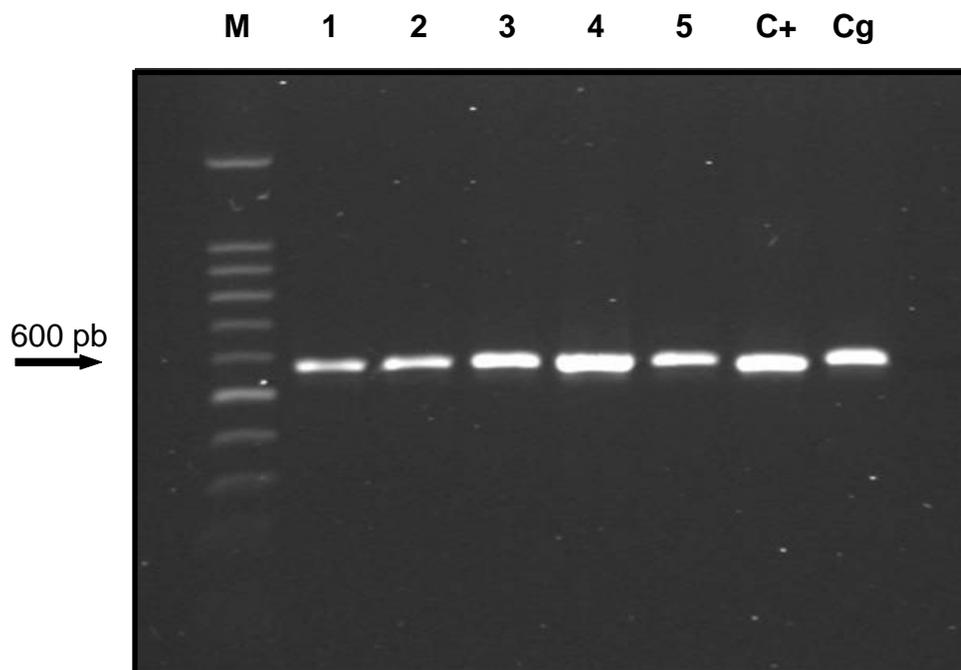


Figura 18. Gel del producto de la amplificación de la región ITS mediante PCR, para los aislados de *C. gloeosporioides* en agarosa 0.8%. M= marcador 100 pb; 1-5= *C. gloeosporioides* (Colle 1-5); C+= control positivo (Morfotipo 1); Cg= control positivo (cepa de *C. gloeosporioides* certificada por CABI Bioscience, RU).

4.12 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de *Colletotrichum* spp.

Se realizó una digestión celular del producto de PCR, utilizando las endonucleasas *Bsa*HI y *Hae*III, para determinar si los aislados de *C. gloeosporioides* presentaban polimorfismos, que se reflejan en diferencias en los patrones de bandas. Por este método y con las enzimas utilizadas, el patrón de bandas presentado por todas las cepas, no mostró variación, indicando que puedan ser la misma especie (Figura 19). Todos los aislados mostraron un patrón de tres bandas. El morfotipo 1 utilizado como control, presentó un patrón de bandas distinto a los aislados *C. gloeosporioides*, lo que indica que son especies diferentes.

4.13 Análisis Bioinformático

El análisis bioinformático realizado con las secuencias de nucleótidos de los aislados de *C. gloespoioides* confirmó la identificación morfológica previa, en su estado teleomorfo, *G. cingulata* y concuerda con el resultado obtenido con el RFLP.

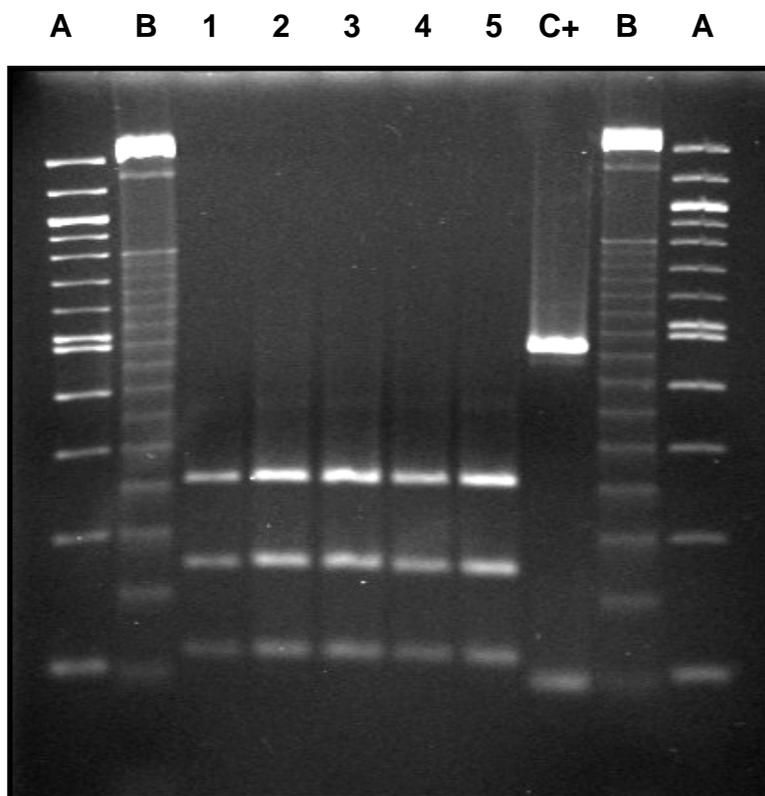


Figura 19. Gel del producto de una digestión doble, utilizando las endonucleasas *Bsa*HI y *Hae*III, mediante RFLP, para los aislados de *C. gloeosporioides* en agarosa 3%. A= marcador 100 pb, B= marcador 50 pb; 1-5= *C. gloeosporioides* (Colle 1-5); C= control positivo, morfotipo 1.

5 CONCLUSIONES

- Los géneros cosmopolitas y de importancia económica fitopatológica como *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Nigrospora*, *Trichoderma* y *Aspergillus* formaron parte de la micoflora aérea sobre la siembra comercial de gandul estudiada. Se pudo encontrar otros géneros en menor frecuencia como: *Penicillium*, *Pestalotia* y *C. gloeosporioides*.
- En los muestreos realizados se reportó *C. gloeosporioides* en menor frecuencia, sin embargo, en estudios preliminares fue reportado con una frecuencia considerablemente más alta. Estos hallazgos sugieren que es necesario realizar muestreos adicionales para determinar si la dispersión a través del aire de este hongo, causante de la antracnosis del gandul, es primordial es su diseminación.
- En los muestreos realizados de las flores, capullos, hojas de gandul, yerba guinea entre la siembra y las pupas de *M. obtusa*, sólo se aisló *C. gloeosporioides* de las hojas de yerba guinea. Esto sugiere que la yerba guinea pueden tener algún rol como fuente de inóculo secundario o ser reservorio de *C. gloeosporioides*. Esto requiere de más estudios para confirmar el verdadero rol de estas plantas en la epidemiología de la antracnosis del gandul.

- La variabilidad macroscópica entre los aislados de *C. gloeosporioides* parece ser característico de este hongo.
- Las medidas de los apresorios y esporas presentaron diferencias mínimas al compararse con las medidas reportadas en estudios previos para *C. gloeosporioides*.
- Todos los aislados examinados fueron patogénicos a las vainas de gandul aunque no se observaron diferencias significativas entre la severidad de los aislados siendo el cultivar I-8-3-1 susceptible a la antracnosis.
- La amplificación por PCR del ADN ribosomal de *C. gloeosporioides*, produjo una banda de un peso molecular aproximado de 600 pb.
- Al realizar una digestión celular del producto de PCR, utilizando las endonucleasas *Bsa*HI y *Hae*III, el patrón de bandas presentado por todas las cepas, no mostró variación, indicando que puedan ser el mismo organismo y diferenciándose del morfotipo 1.
- Las secuenciación de nucleótidos de *C. gloeosporioides* de las regiones ITS, confirman que los aislados estudiados son *Glomerella cingulata*, estado teleomorfo de *C. gloeosporioides*.

6 Recomendaciones

- Se recomienda realizar otros estudios sobre la distribución temporal de *Colletotrichum gloeosporioides*. Estos datos proveerán información sobre la época donde se pueda encontrar con más frecuencia el patógeno, ya que la enfermedad que causa ocurre de forma cíclica en el gandul.
- Se recomienda utilizar más muestreadores en diferentes localidades de la siembra y fuera de la siembra a diferentes alturas.
- Combinar la exposición de plato vertical realizada en el presente estudio, con exposición de plato horizontal, a la altura del cultivo, para poder comparar los métodos y determinar su eficiencia.
- La incidencia de *C. gloeosporioides* durante todas las etapas de este estudio, aunque en frecuencias bajas, debe tomarse en consideración a la hora de implementar medidas para el manejo de plagas.
- Identificar plantas que sirvan como reservorio de inóculo y hospederos secundarios para el patógeno, así como el rol de insectos asociados a la siembra de gandul, como agentes dispersores del patógeno.

REFERENCIAS

- Abbott, S. P. 2002. Insects and other arthropods as agents of vector-dispersal fungi. akaMOLDLAB. Sparks, Nevada. 5pp.
- Afzal, M. y F. Mehdi. 2002. Atmospheric Fungi of Karachi City. Pakistan Journal of Biological Sciences. 5 (6): 707-709.
- Agrios, G. N. 1985. Fitopatología. Editorial Limusa. 756 pp.
- Alameda, M., R. Echávez-Badel y A. Sotomayor-Ríos. 2001. Virulence and cultural characteristics of *Colletotrichum* sp. isolates collected from pigeonpeas pods in Puerto Rico. Memorias 42a. Reunión Americana de Fitopatología-División del Caribe, La Habana, Cuba. p. 96.
- Álvarez, L. 1960. *Phoma* canker of pigeonpeas in Puerto Rico. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. 44: 28-30.
- Arseniuk, E., T. Góral y A. L. Scharen. 1998. Seasonal patterns of spore dispersal of *Phaeosphaeria* spp. and *Stagonospora* spp. Plant Dis. 82: 187-194.
- Aylor, D. E. 1986. A framework for examining inter-regional aerial transport of fungal spores. Agricultural and Forest meteorology. 38 (4): 263-288.
- Aylor, D. E. y S. L. Anagnostakis. 1991. Active discharge distance of ascospores of *Venturia inaequalis*. Phytopathology. 81: 548-551.
- Aylor, D. E. 1998. The aerobiology of apple scab. Plant Disease. 82 (8): 838-849.
- Barnes, E. H. 1979. Atlas and Manual of Plant Pathology. Plenum Press New York. 325 pp.

- Baxter, A.P., G. C. A. van der Westhuizen y A. Eicker. 1985. A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. *Phytophylactica*. 17: 15-18.
- Beagle, J. 2000. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*. 38: 541-576.
- Bothast, R. J., L. R. Beuchat, B. S. Emswiler, M. G. Johnson y M. D. Pierson. Incidence of airborne *Aspergillus flavus* spores in maize fields of five states. 1977. *Applied and Environmental Microbiology*. 35 (3): 627-628.
- Brown, A. E., S. Sreenivasaprasad y L.W. Timmer. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*. 86. 523-527.
- Bruns, T. D., T. J. White y J. W. White. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 22: 525-564.
- Buchwaldt, L., R. A. A. Morrall, G. Chongo y C. C. Bernier. 1996. Windborne dispersal of *Colletotrichum truncatum* and survival in infested lentil debris. *Phytopathology* 86:1193–1198.
- Buddie, A. G., P. Martínez-Culebras, P. D. Bridge, M. D. García, A. Querol, P. F. Cannon y E. Monte. 1999. Molecular Characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. *Mycological Research*. 103 (4): 385-394.
- Chongo, G. y C. C. Bernier. 2000. Effects of host, inoculum concentration, wetness duration, growth stage, and temperature on anthracnose of lentil. *Plant Disease*. 84 (5): 544-548.
- CNCPP (Center for New Crops & Plants Products, University of Purdue). 1997. *Cajanus cajan* (L.) Millsp. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Cajanus_cajun.html. Accedido mayo, 2005.

- Coe, F. G. y G. J. Anderson. 1996. Ethnobotany of the Garífuna of eastern Nicaragua. *Economic Botany*. 50 (1): 71-107.
- Conjunto Tecnológico para la Producción de Gandules. 1992. Estación Experimental Agrícola, Colegio de Ciencias Agrícolas, Recinto de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico. 18 pp.
- Dagar, H. S. y J. C. Dagar 1991. Plant folk medicines among the Nicobarese of Katchal Island. *India. Economic Botany*. 45 (1): 114-119.
- Davis, R. D., R. M. Boland y C. J. Howitt. 1992. Colony descriptions, conidium morphology, and the effect of temperature on colony growth of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Stylosanthes* spp. growing in several countries. *Mycological Research*. 96 (2): 128-134.
- Deacon, J. W. 1997. *Modern Mycology*. Third edition. Blackwell Science, Oxford, UK. 303 pp.
- De Lapeyre de Bellaire, L. M. Chillet, C. Dubois y X. Mourichon. 2000. Importance of different sources of inoculum and dispersal methods of conidia of *Colletotrichum musae*, the causal agent of banana anthracnose, for fruit contamination. *Plant Pathology*. 49: 782-790.
- Del Ponte, E ., J. Mauricio , C. Fernandes y C. Pierobom. 2005. Factors affecting density of airborne *Gibberella zeae* inoculum. *Fitopatologia Brasileira*. 30: 55-60.
- Denoyes-Rothan, B., G. Guérin, C. Délye, B. Smith, D. Minz, M. Maymon y S. Freeman. 2003. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. *Phytopathology*. 93:219-228.
- Departamento de Agricultura. 2002. Ingreso bruto de la agricultura de Puerto Rico 1999/2000. Compendio Estadístico 2002. Oficina de Estadísticas Agrícolas. Estado Libre Asociado de Puerto Rico, Santurce, PR.

- Departamento de Agricultura. 2005. Producción local: habichuelas y gandures. Ingreso Bruto Agrícola, Departamento de Agricultura. Estado Libre Asociado de Puerto Rico, Oficina de Estadísticas Agrícolas, Santurce, PR.
- Domsch, K. H., W. Gams y T. H. Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, London, UK. 859 pp.
- Du, M., C. L. Schardl, E. M. Nuckles, L. J. Vaillancourt. 2005. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia*. 97: 641-658.
- Echávez, R. y M. Alameda. 1998. Incidence of anthracnose in long-day pigeonpea trials. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*. 82 (3-4): 209-211.
- Ellis, M. A. y H. I. Paschal. 1977. Methods of controlling internally seedborne fungi of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Proceedings of American Phytopathology Society*. 4:176.
- Ellis, M. A. y H. I. Paschal. 1979. Effect of fungicide seed treatment on internally seedborne fungi, germination and field emergence of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Seed Science & Technology*. 7:51-81.
- Fernando, T. H. P. S., C. K. Jayasinghe y R. L. C. Wijesundera. 2000. Factors affecting spore production, germination and viability of *Colletotrichum acutatum* isolates from *Hevea brasiliensis*. *Mycological Research*. 104 (6): 681-685.
- Freeman, S y R. J. Rodríguez. 1995. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible of anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. *Mycological Research*. 99: 501-504.
- Freeman, S., T. Katan y E. Shabi. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (3): 1014-1020.

- Freeman, S., T. Katan y E. Shabi. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*. 82 (6): 596-605.
- Freeman, S., E. Shabi y T. Katan. 2000. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (12); 5267-5272.
- Grondona, I., M. R. Hermosa, M. Tejada, M. D. Gomis, P. F. Mateos. P. D. Bridge, E. Monte y I. García-Acha. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent of soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3189-3198.
- Harrison, J.G., R. Lowe, N.A. Williams. Humidity and fungal diseases of plants problems. En: Blakeman, J.P., B. Williamson. 1994. *Ecology of plant pathogens*. Wallingford, CAB International. 79-97 pp.
- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton y D. N. Pegler. 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. 616 pp.
- Hepperly, P. R. y R. Rodríguez, 1984. Microfloral Succession and Viability Losses in Pigeon pea Seed in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico* 68(1): 19-31.
- Hutchison, K., S. Perfect, R. O'Connell y J. Green. 2000. Immunomagnetic purification of *Colletotrichum lindemuthianum* appressoria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (8): 3464-3467.
- Ingold, C. T. 1953. *Dispersal in fungi*. Oxford University Press, London UK. 197 pp.
- Isard, S. y S. Gage. 2001. *Flow of life in the Atmosphere*. Michigan State University Press. 240 pp.

- Jeffries, P., J. C. Dodd, M. J. Jeger y R. A. Plumbly. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology* 39: 343-366.
- Kaiser, W. J. 1981. Diseases of chickenpea, lentil, pigeon pea, and tepary bean in continental United States and Puerto Rico. *Economic Botany*. 35 (3): 300-320.
- Lenné, J. M. 1992. *Colletotrichum* diseases of legumes. En: Bailey, J. A. y M. J. Jeger. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. British Society for Plant Pathology (Ed.) UK. 134-165 pp.
- Limpert, E., F. Godet y K. Müller. 1999. Dispersal of cereal mildews across Europe. *Agricultural and Forest Meteorology*. 97 (4): 293-308.
- Lozada, C., B. Ortiz y C. Betancourt. 1998. *Introducción a la Micología Médica*. Imprenta Universitaria, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, Puerto Rico. 227 pp.
- Maldonado-Ramírez, S. L., D. G. Schmale III, E. J. Shields y G. C. Bergstrom. 2005. The relative abundance of viable spores of *Gibberella zea* in the planetary boundary layer suggests the role of long-distance transport in regional epidemics of *Fusarium* head blight. *Agricultural and Forest Meteorology*. 132: 20-27.
- Nene, Y. L. 1988. Multiple-disease resistance in grain legumes. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 203-217.
- Nene, Y. L. y V. K. Sheila. 1996. Diseases of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *The American Phytopathological Society*. <http://www.scisoc.org/resource/common/names/pigeon.htm>. Accedido marzo, 2005.

- Ntahimpera, N., H. R. Dillard y R. C. Seem. 1996. Anthracnose development in mixtures of resistant and susceptible dry bean cultivars. *Phytopathology*. 86: 668-673.
- Ntahimpera, N., L. V. Madden y L. L. Wilson. 1997. Effect of rain distribution alteration on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*. 87:649-655.
- Ntahimpera, N., L. L. Wilson, M. A. Ellis y L. V. Madden. 1999. Comparison of rain effects on splash dispersal of three *Colletotrichum* species infecting strawberry. *Phytopathology* 89: 555-563.
- Parbery, D. G. 1981. Biology of anthracnoses on leaf surfaces. In: *Microbial Ecology of the Phylloplane* (Ed. By J. P. Blakeman). Academic Press, London. 135-154 pp.
- Picco, A. M. y M. Rodolfi. 2002. *Pyricularia grisea* and *Bipolaris oryzae*: a preliminary study on the occurrence of airborne spores in a rice field. *Aerobiologia*. 18 (2): 163-167.
- Prados-Ligero, A. M., J. M. Melero-Vara, C. Corpas-Hervías y M. J. Basallote-Ureba. 2003. Relationships between weather variables, airborne spore concentrations and severity of leaf blight of garlic caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 109 (4): 301-310.
- Starr, C. y R. Taggart. 1998. *Biology: The unity and diversity of life*. Eighth edition Wadsworth Publishing Company. 920pp.
- Sutton, B. 1980. *The Coelomycetes: The fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 661pp.
- Swart, G. M. 1999. Comparative study of *Colletotrichum goeosporioides* from avocado and mango. Tesis Ph.D. Univerisity of Pretoria, South Africa. 200 pp.

- Talley, S. M., P. D. Coley y T. A. Kursar. 2002. The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Ecology*. 2(7): 1472-6785.
- Tu, J. C. 1988. Control of bean anthracnose caused by delta and lambda races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Canada. *Plant Disease*. 72:5-8.
- Tucker, C. F. 1927. Pigeon pea anthracnose. *Journal of Agricultural Research*. 34(6):589-596.
- Van Schoonhoven, A. y M. A. Pastor-Corrales. 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. CIAT, Cali Colombia. 53 pp.
- Vélez, L., L. Rivera, R. del P. Rodríguez y I. Cabrera. 2004. Hongos asociados al cultivo de la cebolla (*Allium cepa* L.) en la zona sur de Puerto Rico. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*. 88 (1-2): 55-72.
- Von Arx, J. A. 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. *Phytopathologische Zeitschrift*. 29: 413-468.
- Von Arx, J. A. 1970. A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. *Bibliotheca Mycologica*. 24: 1-203.
- Wajid Khan, M. y R. K Singh. 1974 Anthracnose of arhar incited by *Colletotrichum truncatum*. *Indian Phytopathology*. 27: 622-624.
- Walker, J. 1980. Taxonomy, specimens and plant diseases. Daniel McAlpine Memorial Lecture. Australasian Plant Pathology Society. <http://www.australasianplantpathologysociety.org.au/McAlpine/DM3.htm>. Accedido mayo, 2005.
- Webster, J. 1980. Introduction to Fungi. 2da. edición. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 669 pp.

- Wharton, P. 2001. Identity of the sorghum anthracnose pathogen. The pathogen: Sorghum anthracnose diseases, Michigan State University. <http://www.sorghumanthracnose.org/pathogen.html>. Accedido mayo, 2005.
- White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee y J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. pp 315-322. En: PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual. Eds, N. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky y T. White. Academic Press, New York
- Yang, X., L. V. Madden, L. L. Wilson y M. A. Ellis. 1980. Effects of surface topography and rain intensity on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. Phytopathology. 80: 1115-1120.

APÉNDICE

APÉNDICE A. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Relación positiva entre el total de hongos aislados del primer muestreo, y la presión barométrica (x5) y la humedad relativa (x3) ($P \leq 0.1$).

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	20.22222	10.11111	22.75	0.0016
Error	6	2.66667	0.44444		
Corrected Total	8	22.88889			

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	-8804.79892	1361.13175	18.59756	41.84	0.0006
x3	1.80477	0.36630	10.78904	24.28	0.0026
x5	293.07910	45.18555	18.69769	42.07	0.0006

Summary of Forward Selection								
Step	Variable Entered	Label	Number Vars In	Partial R-Square	Model R-Square	C(p)	F Value	Pr > F
1	x5	presión	1	0.4121	0.4121	25.2753	4.91	0.0623
2	x3	humedad	2	0.4714	0.8835	3.0000	24.28	0.0026

Relación positiva entre el total de hongos aislados del segundo, tercero y cuarto muestreo, y la presión barométrica (x5) ($P \leq 0.1$).

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	96.24402	96.24402	4.39	0.0581
Error	12	263.25598	21.93800		
Corrected Total	13	359.50000			

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	-718.54829	355.23475	89.75901	4.09	0.0660
x5	25.02445	11.94747	96.24402	4.39	0.0581

Relación positiva entre el total de aislados de *Cladosporium* spp. del segundo, tercero y cuarto muestreo, y la temperatura (x2), humedad relativa (x3) y punto de rocío (x4) ($P \leq 0.1$).

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	37.73600	12.57867	11.84	0.0013
Error	10	10.62115	1.06211		
Corrected Total	13	48.35714			

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	-182.45713	45.73731	16.90253	15.91	0.0026
x2	7.21564	1.84428	16.25805	15.31	0.0029
x3	1.98094	0.53663	14.47320	13.63	0.0042
x4	-7.10591	1.98301	13.63839	12.84	0.0050

Relación positiva entre el total de aislados de *Alternaria* spp. del segundo, tercero y cuarto muestreo, y la temperatura (x2), humedad relativa (x3) y punto de rocío (x4) ($P \leq 0.1$).

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	106.73313	26.68328	7.14	0.0071
Error	9	33.62402	3.73600		
Corrected Total	13	140.35714			

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	-642.49701	176.19001	49.68059	13.30	0.0053
x2	10.87694	3.46439	36.82715	9.86	0.0119
x3	2.94089	1.00965	31.69708	8.48	0.0172
x4	-10.79339	3.72339	31.39399	8.40	0.0176
x5	12.51059	5.40770	19.99574	5.35	0.0460

Relación positiva entre los hongos más frecuentes (*Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Cladosporium* y HCER) del segundo, tercero y cuarto muestreo, y la cantidad de aislados de cada especie por muestreo ($P \leq 0.05$).

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
muestreo	2	40	0.37	0.6952
altura	1	40	0.18	0.6704
tiempo	2	40	0.68	0.5147
altura*tiempo	2	40	0.12	0.8896
sp	4	40	2.50	0.0575
altura*sp	4	40	0.27	0.8933
tiempo*sp	8	40	0.82	0.5893
altura*tiempo*sp	8	40	0.76	0.6389
muestreo*sp	8	40	3.52	0.0036

Relación positiva entre *Fusarium* (especie 1), *Cladosporium* (especie 14) y *Alternaria* (especie 15) y la cantidad de aislados por muestreo ($P \leq 0.05$).

Tests of Effect Slices					
Effect	sp	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
tiempo*sp	1	2	40	0.46	0.6336
tiempo*sp	2	2	40	0.10	0.9008
tiempo*sp	14	2	40	1.32	0.2777
tiempo*sp	15	2	40	0.56	0.5747
tiempo*sp	16	2	40	1.51	0.2340
muestreo*sp	1	2	40	3.62	0.0358
muestreo*sp	2	2	40	0.65	0.5265
muestreo*sp	14	2	40	3.51	0.0393
muestreo*sp	15	2	40	3.58	0.0370
muestreo*sp	16	2	40	3.09	0.0567
altura*sp	1	1	40	0.11	0.7417
altura*sp	2	1	40	0.01	0.9125
altura*sp	14	1	40	0.78	0.3815
altura*sp	15	1	40	0.07	0.7976
altura*sp	16	1	40	0.31	0.5833

Relación positiva entre la altura de exposición y el total de los aislados, y diferencias significativas en la cantidad de aislados de cada especie, durante el segundo, tercero y cuarto muestreo ($P \leq 0.05$).

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
altura	1	417	4.55	0.0335
tiempo	2	417	1.42	0.2428
sp	27	417	19.20	<.0001

Diferencias significativas en la cantidad de aislados de cada especie, en el segundo, tercero y cuarto muestreo, en donde los hongos aislados con más frecuencia son *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Cladosporium* y HCER ($P \leq 0.05$).

Obs	altura	sp	Estimate	Standard Error	Letter Group
1	–	HCER	420.09	17.7060	A
2	–	<i>Fusarium</i>	408.46	17.7060	AB
3	–	<i>Curvularia</i>	401.02	17.7060	AB
4	–	<i>Alternaria</i>	325.43	17.7060	BC
5	–	<i>Cladosporium</i>	321.34	17.7060	BC
6	–	<i>Drechslera</i>	258.49	17.7060	CD
7	–	<i>Nigrospora</i>	236.77	17.7060	CDE
8	–	<i>Aspergillus</i>	232.87	17.7060	CDE
9	–	<i>Penicillium</i>	207.24	17.7060	DE
10	–	<i>Trichoderma</i>	203.93	17.7060	DE
11	–	<i>Pithomyces</i>	200.96	17.7060	DE
12	–	<i>Pestalotia</i>	200.06	17.7060	DE
13	–	<i>Aspergillus niger</i>	197.81	17.7060	DE
14	–	<i>Phoma</i>	195.56	17.7060	DE
15	–	<i>Sirosporium</i>	195.56	17.7060	DE
16	–	<i>Eurotium</i>	186.12	17.7060	DE
17	–	<i>Mucor</i>	186.12	17.7060	DE
18	–	<i>Acremonium</i>	183.87	17.7060	DE
19	–	<i>Phomopsis</i>	183.87	17.7060	DE
20	–	<i>C. gloeosporioides</i>	183.87	17.7060	DE
21	–	Morfotipo 1	172.18	17.7060	DE
22	–	<i>Spegazzinia</i>	172.18	17.7060	DE
23	–	<i>Passalora</i>	172.18	17.7060	DE

Obs	altura	sp	Estimate	Standard Error	Letter Group
24	–	<i>Ulocladium</i>	172.18	17.7060	DE
25	–	<i>Sphaeropsis</i>	172.18	17.7060	DE
26	–	<i>Aspergillus terreus</i>	160.49	17.7060	E
27	–	<i>Rhizopus</i>	160.49	17.7060	E
28	–	<i>Paecilomyces</i>	160.49	17.7060	E

Relación positiva entre la altura de exposición y el total de los aislados, en donde la altura de más aislados fue a 290 cm ($P \leq 0.05$).

Obs	altura	sp	Estimate	Standard Error	Letter Group
29	290	_	231.12	4.7726	A
30	140	_	216.86	4.7726	B

Relación positiva de la severidad de la infección a los cinco y a los siete días para los aislados Colle 2, 4 y 5 ($P \leq 0.05$).

hongo*tiempo Effect Sliced by hongo for pat					
hongo	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Colle1	1	2560.000000	2560.000000	2.86	0.0986
Colle2	1	6250.000000	6250.000000	6.98	0.0117
Colle3	1	1690.000000	1690.000000	1.89	0.1770
Colle4	1	7562.500000	7562.500000	8.45	0.0059
Colle5	1	7290.000000	7290.000000	8.15	0.0068