EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS ORGÁNICOS Y CONVENCIONALES PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES FOLIARES EN ÑAME (*DIOSCOREA ALATA* L.)

Por

Yara Ivelisse Rosado Rivera

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

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

PROTECCIÓN DE CULTIVOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ

2016

Aprobado por:

_____	_____
Merari Feliciano Rivera, Ph. D. Presidenta, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Agenol González Vélez, M.S. Miembro, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Martha C. Giraldo, Ph. D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Abner Rodríguez, Ph. D. Representante de Estudios Graduados	Fecha
_____	_____
Elvin Román Paoli, Ph. D. Director Interino de Departamento	Fecha

ABSTRACT

Yams (*Dioscorea* spp.) belonging to the family of the Dioscoreaceae was of considerable economic importance in Puerto Rico in the 80's agricultural production. Since the 90's its local production has been dramatically declining due to different pests and diseases, economic constraints and high production costs. The lack of effective fungicides has limited farmers to manage foliar diseases such as anthracnose and other foliar diseases in yam. Thus, the objectives of this research were: 1. To evaluate *in vitro* and *in vivo* organic and conventional fungicides to manage foliar diseases in yam, 2. To identify the causal agent of the yam dieback in the cultivar Florido and 3. To evaluate the sensitivity of two *Colletotrichum* isolates to azoxystrobin.

The fungicides selected for in vitro and in vivo experiments were Switch®, Trilogy®, Regalia®, Kphite®, Chlorothalonil®, Fontelis®, Kocide® and Quadris®. The latter being the only foliar fungicide registered to be used in yams in Puerto Rico. A colorimetric assay was used in the in vitro phase to evaluate the efficacy of fungicides. The field experiment was established at the Agricultural Experiment Station in Isabela and the design used was a randomized complete block with four blocks and ten treatments. For the study of the etiology of stem dieback in the cultivar, Florido symptomatic samples were collected in the yam storage facilities at the Agricultural Experiment Station in Isabela. With the isolates obtained, a pathogenic, morphological and molecular characterization was performed. The evaluation of the sensitivity of *Colletotrichum* isolates to azoxystrobin was conducted using a PDA plates amended with the fungicides with eight treatments and four replications.

In vitro, Chlorothalonil® 720, Switch® and Fontelis® were the most effective fungicide inhibiting the mycelial growth of *C. gloesporioides* and *C. alatae*. In field experiments, the most effective fungicides for managing foliar diseases of yam including anthracnose was Switch®. None of the plant-based extracts (Trilogy® and Regalia® SC) and the other conventional fungicides evaluated provided a significant reduction in disease severity.

Eight fungi were isolated from the symptomatic stem of *Dioscorea alata* cv. Florido. Six of these fungi resulted to be pathogenic in the Koch's postulates. The identified fungi combining morphology and phylogenetic analysis were *Colletotrichum queenslandicum, Fusarium oxysporum* (2 isolates), *Fusarium* sp. and two isolates of the Botryosphaereaceae family. *Colletotrichum queenslandicum* was the most virulent isolate causing lesions three days after of the initial inoculation.

In the evaluation of the sensitivity to azoxystrobin, both isolates (*C. alatae* and *C. gloesporioides*) grew in the amended media with the fungicide similar to the non-amended treatment. These results suggest the inheritance development of resistance by *Colletotrichum* isolates exposed to azoxystrobin in the island.

All of the results presented in the present research provide a significant advance in the evaluation of the efficacy of OMRI-certified fungicide and conventional fungicides to manage important foliar diseases of yam in Puerto Rico. Also, resistance of *Colletotrichum* isolates to azoxystrobin could be high to moderate and resistance management should be considered.

RESUMEN

El cultivo del ñame (*Dioscorea* spp.) perteneciente a la familia de las Dioscoreáceas fue de gran importancia económica en Puerto Rico hasta los años 80. Desde los 90 la producción local ha ido disminuyendo de manera drástica debido a diferentes plagas y enfermedades, limitaciones económicas y altos costos de producción. La falta de fungicidas efectivos ha limitado a los agricultores en el manejo de enfermedades foliares en el ñame como la antracnosis causada por *Colletotrichum gloesporioides*. Debido a esto, se desarrollaron los siguientes objetivos como parte de esta investigación; 1. Evaluación de fungicidas orgánicos y convencionales *in vitro* e *in vivo* para el manejo de enfermedades foliares en el ñame, 2. Identificación de organismos causante de la muerte regresiva del tallo en el cultivar Florido y 3. Evaluar la sensibilidad de dos aislados de *Colletotrichum* al azoxystrobin.

Los fungicidas seleccionados para los experimentos *in vitro* e *in vivo* fueron Switch®, Trilogy®, Regalia®, Kphite®, Chlorothalonil®, Fontelis®, Kocide® y Quadris®. Siendo este último el único fungicida con registro de uso foliar en ñame en Puerto Rico. En la fase *in vitro* se utilizó un ensayo colorimétrico para evaluar la eficacia de los fungicidas. El experimento de campo fue establecido en la Estación Experimental Agrícola en Isabela y se utilizó un diseño de bloques completos al azar, con cuatro bloques y 10 tratamientos. Para el estudio de la etiología de la muerte regresiva del tallo en el cultivar Florido se colectaron muestras sintomáticas en los almacenes de la EEA en Isabela. Con los aislados obtenidos se realizó una caracterización patogénica, morfológica y molecular de los hongos asociados a esta sintomatología. La evaluación de la sensibilidad de los aislados de *Colletotrichum* a azoxystrobin se realizó utilizando platos de PDA enmendados con el fungicida, con ocho tratamientos y cuatro repeticiones.

Objetivo 1: Los fungicidas Chlorothalonil®, Fontelis® y Switch® fueron los que mejor inhibieron el crecimiento micelial de *C. gloesporioides* y *C. alatae* en los ensayos colorimétricos *in vitro*. Mientras que Switch® fue el único que fue estadísticamente diferente comparada con el control no tratado en controlar la enfermedad de antracnosis *in vivo*. Ninguno de los tratamientos a base de extracto de plantas (Trilogy® y Regalia®) y los otros fungicidas convencionales fueron significativamente diferente en la reducción de la severidad.

Objetivo 2: Se aislaron ocho hongos del tallo del ñame *Dioscorea alata* cv. Florido con tejido sintomático. Seis resultaron ser patogénicos en los postulados de Koch. La identificación morfológica y filogenética fueron *Colletotrichum queenslandicum*, *Fusarium oxysporum* (2 aislados), *Fusarium* sp. y dos aislados de la familia Botryosphaereaceae. *Colletotrichum queenslandicum* fue el aislado más virulento causando lesiones a los tres días de la inoculación inicial.

Objetivo 3: En la evaluación de la sensibilidad, ambos aislados (*C. gloesporioides* y *C. alatae*) crecieron en el medio enmendado con fungicida al igual que él no enmendado. Estos resultados sugieren el desarrollo de resistencia de aislados de *Colletotrichum* expuestos a azoxystrobin en la isla.

Todos los resultados presentados en esta investigación proveen un avance significativo en la evaluación de la eficacia de los fungicidas certificados OMRI y convencionales para manejar

enfermedades foliares importantes en ñame en Puerto Rico. Además, la resistencia de aislados a *Colletotrichum* a azoxystrobin puede ser de mediana a alta y el manejo de la resistencia debe ser considerada.

A quienes me enseñaron que, para alcanzar una meta, hay que aprender a luchar, mis viejos.

Mis padres: Blanca M. Rivera y Jeremías Rosado

A mi compañero de vida, mi cómplice, mi paño de lágrimas, mis ganas de seguir luchando, a ti.

Ángel G. Díaz Oquendo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por que sin el nada y con el todo, por colocarme ángeles en el camino para poder alcanzar mis metas. A mi consejera, la Dra. Merari Feliciano por haber puesto toda su confianza en mí y brindarme la oportunidad de ser miembro de su maravilloso equipo de trabajo. A los miembros de comité, el Prof. Agenol González y Dra. Martha Giraldo, por estar siempre dispuestos a ayudarme, por su amplio conocimiento y apoyo durante esta investigación. A Jesús Cardona y Edwin Monroig Jr., por su apoyo total en los experimentos de campos y aspersiones en la Estación Experimental Agrícola de Isabela. Al proyecto de investigación Z-FIDA 22 por proveer todos los fondos para que fuese posible el desarrollo de la investigación. A los Agros. Víctor González y Luis Collazo por su enorme ayuda, por siempre estar presente y proveer todos los equipos y materiales necesarios para los laboratorios. A mis compañeros de laboratorio; Lorena Simbaña, Casiani Soto, Stephanie Fuentes, Cecilia Monclova, Yaniel Román y a Yency Castillo, que gracias a ustedes las horas se acortaban y siempre estuvieron dispuestos a ayudar. Igualmente quiero agradecer a la Dra. Lydia Rivera por sus consejos, asesorías y ayuda incondicional. Al personal de campo de la Estación Experimental Agrícola de Isabela por su arduo trabajo. Finalmente agradezco a mi familia por su apoyo incondicional, por siempre estar ahí, por ser mi fuente de motivación y superación en momentos difíciles. Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Página

ABSTRACT..... ii

RESUMEN iii

DEDICATORIA v

AGRADECIMIENTOS vi

TABLA DE CONTENIDO..... vii

LISTA DE FIGURAS.....x

LISTA DE TABLAS…….……xv

LISTA DE APÉNDICES……..xvi

CAPÍTULO 1: Revisión de Literatura…….1

Producción e importancia económica del cultivo de ñame……..1

Origen y descripción botánica del cultivo de ñame…….3

Fenología de las plantas de ñame…….4

Importancia nutricional del cultivo……..5

Enfermedades del ñame……...7

Antracnosis del ñame: *Colletotrichum gloesporioides*…….....8

Medidas de control para antracnosis…… .10

Control químico…….10

Control biológico……...11

Uso de cultivares resistentes……..12

CAPÍTULO 2: Evaluación de la eficacia de fungicidas orgánicos y convencionales *in vitro* e *in vivo* para el manejo de enfermedades foliares en ñame (*Dioscorea alata* cv. Diamantes)……...14

Introducción……...14

Materiales y Métodos……16

Aislamiento de hongos…….....16

Preparación y diluciones de los materiales para los experimentos de *in vitro* e *in vivo*...17

Certificados OMRI……17

Fungicidas convencionales……17

Evaluación *in vitro* de la inhibición del micelio de dos aislados de *Colletotrichum*……..18

Evaluación *in vivo* de fungicidas para el manejo de enfermedades foliares……..20

Severidad de la enfermedad…….. 21

Análisis estadísticos……...26

Resultados……..26

Certificados OMRI……26

Fungicidas convencionales……26

Aislados encontrados en los muestreos aleatorios en campo……27

Discusión…….. 40

Conclusión…….46

CAPÍTULO 3: Etiología de la muerte regresiva del tallo del ñame Florido (*Dioscorea alata* cv. Florido) en condiciones de almacenaje……47

Introducción……..47

Materiales y Métodos……48

Recolección de muestras y síntomas…….48

Cámaras húmedas……..48

Aislamiento e identificación de hongos…….49

Pruebas de patogenicidad……..51

Caracterización molecular…….53

Análisis estadísticos……...55

Resultados……...55

Recolección de muestras y síntomas……..55

Aislamiento e identificación de hongos…….56

Pruebas de Patogenicidad……..57

Caracterización molecular…….57

Discusión……64

Conclusión…….....67

CAPÍTULO 4: Evaluación de la sensitividad de aislados de *Colletotrichum* a azoxystrobin …..68

Introducción……...68

Materiales y métodos…….70

Aislados de *Colletotrichum gloesporioides* y *Colletotrichum alatae*……....70

Evaluación de la sensibilidad de *Colletotrichum* spp. a azoxystrobin……...70

Análisis estadísticos……...71

Resultados……..75

Evaluación de la sensibilidad de *Colletotrichum* spp. a azoxystrobin……...75

Diferencias fenotípicas de aislados de *Colletotrichum* expuestos a azoxystrobin.76

Discusión……81

Conclusión……..... 83

LITERATURA CITADA……..84

Apéndice 1…….92

Apéndice 2…….94

Apéndice 3……...103

Apéndice 4……...113

Apéndice 5…….....117

Apéndice 6……...…121

Apéndice 7……...124

Apéndice 8……...133

Apéndice 9……...139

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Producción local de ñame en Puerto Rico desde el año 1990 hasta el 2014 (Departamento de Agricultura, 2014).	2
Figura 2.	Tasa de importación de ñame en Puerto Rico desde el año 1985 hasta el 2014 (Departamento de Agricultura, 2014).	2
Figura 3.	Morfología del ñame Florido (*Dioscorea alata*) y *D. rotundata* Tomado de: L.H. Balley Standard Cyclopedia of Horticulture, 2015.	4
Figura 4.	Ciclo de la antracnosis causado por *Colletotrichum gloesporioides* y *Glomerella cingulata* (Agrios, 2005).	9
Figura 5.	Diagrama utilizado para la identificación de las partes a tratar con y sin conidios.	19
Figura 6.	Localización del predio donde se realizó la investigación en la Estación Experimental Agrícola de Isabela de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez (18.464504, -67.053931).	22
Figura 7.	Materiales utilizados para las pruebas colorimétricas *in vitro* (A). Bomba de aspersión (SOLO, USA) de espalda para la aplicación de fungicidas (B). Trabajador agrícola encargado par las aperciones de los fungicidas en campo (C).	24
Figura 8.	Diseño experimental DBCA para la evaluación de fungicidas a nivel de campo, utilizando dos cultivares de *D. alata*; Diamantes y Florido.	25
Figura 9.	Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Trilogy® para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B). Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas).	29
Figura 10.	Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Regalia® para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B). Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de	30

inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas).

Figura 11. Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Kphite®7LP para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B). Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). 31

Figura 12. Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Fontelis™ para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B). Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). 32

Figura 13. Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Kocide®3000 para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B). Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). 33

Figura 14. Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Switch®62.5 WG los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B). Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de 34

incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). 35

Figura 15. Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Chlorothalonil® los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B). Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas).

Figura 16. Porcentaje de la severidad de la enfermedad transformado a log en base al tiempo. 37

Figura 17. Correlación entre los rendimientos (kg/ha) y la severidad (AUDPC) de la enfermedad. 37

Figura 18. Desarrollo de la intensidad de la epidemia (%) durante el tiempo para todos los tratamientos fúngicos. 38

Figura 19. Precipitación (pulg) promedio por cada mes de toma de datos en la Estación Experimental Agrícola en Isabela PR de la Universidad de Puerto Rico. 38

Figura 20. Síntomas observados en el tallo del ñame Florido en los almacenes de la Estación Experimental Agrícola en Isabela. Muerte regresiva del ápice a la base del tallo. 49

Figura 21. Preparación de pruebas de patogenicidad. Tubérculos sanos y estériles para la preparación de las pruebas de patogenicidad (A) y cajas de humedad donde se encuentran los tubérculos con los discos de micelio (B). 51

Figura 22. Preparación de pruebas de patogenicidad para los hongos aislados de la muerte regresiva del tallo. 52

Figura 23. Cortes de tejido realizado a los tallos del ñame cv Florido en las cámaras húmedas. Conidios característicos del género *Fusarium* (A) y conidios característicos del género *Colletotrichum* (B). 56

Figura 24. Hongos patógenos asociados a la muerte regresiva del tallo. Los géneros; *Colletotrichum* sp. (A, B, C), *Botryosphaeriaceae*. (D, E, F, G, H, I), 59

Fusarium spp. (J, K, L, P, Q, R), un desconocido (M, N, O).

Figura 25. Estructuras de reproducción asociados al género *Colletotrichum*. Apresorio circular, márgenes enteros y célula marcada en el centro (A) y conidios ovoides, cilíndricos con ápices obtusos (B). 61

Figura 26. Árbol filogenético concatenado con los géneros de ITS y ß-tubulina analizado por el método Maximum likelihood para el género de *Colletotrichum*. *C. pisi* fue utilizado como outgroup debido a la separación del complejo de *Colletotrichum gloesporioides.* 62

Figura 27. Árbol filogenético concatenado con los géneros de ITS y ß-tubulina analizado por el método Maximum likelihood para el género de *Fusarium.* 63

Figura 28. *Colletotrichum gloesporioides* aislado de *Dioscorea. alata* cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorios circular con márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y con ápices obtusos. Barra = 10 µm (Fuentes, 2015). 72

Figura 29. *Colletotrichum alatae* aislado de *Dioscorea alata* cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorios circular con margen entero. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm (Fuentes, 2015). 73

Figura 30. Inhibición de la tasa de crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum alatae* procedente del pueblo de Utuado al AZ a los 8 días. Barras de color son del primer experimento y las barras blancas son del experimento 2. 77

Figura 31. Inhibición de la tasa de crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum gloesporioides* procedente del pueblo de Moca a AZ a los ocho días. Barras de color son del primer experimento y las barras blancas son del experimento 2. 78

Figura 32. Diferencias en la morfología, producción de micelio, color de micelio y presencia de cuerpos fructíferos asociado a diferentes concentraciones de estrobilurinas para el aislado de *Colletotrichum alatae*. Tratamiento no enmendado, producción normal del micelio y sus estructuras (A), enmendado con AZ 0.1 µg/ml, cambio en el color de la colonia (B), enmendado con AZ 1.0 µg/ml, color y forma del micelio diferente (C), enmendado con AZ 10 µg/ml, micelio aéreo con una tonalidad más blanca (D), enmienda con SHAM µg/ml, micelio con crecimiento anormal rastrero y tonalidad clara (E), emendado con AZ 0.1 µg/ml + SHAM µg/ml, se observa coloración oscura del micelio (F), la enmienda de AZ 1.0 µg/ml + SHAM µg/ml, crecimiento normal del micelio con una 79

tonalidad más oscura (G) y la enmienda de AZ 10 µg/ml + SHAM µg/ml, posee un crecimiento no normal del hongo con crecimiento excesivo de micelio y estructuras bien marcadas (H).

Figura 33. Diferencias en la morfología, producción de micelio, color de micelio y presencia de cuerpos fructíferos asociado a diferentes concentraciones de estrobilurinas para el aislado de *Colletotrichum gloesporioides*. Tratamiento no enmendado, producción normal del micelio (A), enmendado con AZ 0.1 µg/ml, crecimiento poco menos abundante cambio en color (B), enmendado con AZ 1.0 µg/ml, color y forma del micelio diferente (C), enmendado con AZ 10 µg/ml, micelio rastrero con una tonalidad más clara (D), enmienda con SHAM µg/ml, micelio con crecimiento normal (E), emendado con AZ 0.1 µg/ml + SHAM µg/ml, se observa coloración típica con un crecimiento poco limitado (F), la enmienda de AZ 1.0 µg/ml + SHAM µg/ml, crecimiento normal del micelio con una tonalidad más clara (G) y la enmienda de AZ 10 µg/ml + SHAM µg/ml, posee un crecimiento normal del hongo con poca producción de cuerpos fructíferos (H). 80

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Valores nutricionales del ñame (USDA, 2013).	6
Tabla 2.	Resistencia de cultivares de ñames a antracnosis (Mignucci, et al., 1988).	16
Tabla 3.	Concentraciones de fungicidas utilizadas en el ensayo colorimétrico *in vitro*.	22
Tabla 4.	Tratamientos fúngicos y concentraciones utilizadas a nivel *in vivo.*	23
Tabla 5.	Análisis estadísticos de la severidad del área bajo la curva de la enfermedad estandarizado, último dato de severidad y los rendimientos en base a los tratamientos fúngicos.	36
Tabla 6.	Características de las bacterias aisladas de las muestras obtenidas de muestras foliares en el experimento *in vivo* de *Dioscorea alata* cv. Florido.	39
Tabla 7.	Resistencia de cultivares de ñame a diferentes enfermedades (Mignucci et al., 1988).	48
Tabla 8.	Medidas (media µm) de las estructuras de reproducción de los aislados.	57
Tabla 9.	Descripción fenotípica de los aislados en medio de cultivo PDA luego de siete días de incubación a 28° C.	60
Tabla 10.	Tasa de crecimiento micelial de los seis hongos patógenos.	61
Tabla 11.	Tratamientos utilizados para evaluar la sensibilidad de los aislados de *Colletotrichum* a azoxystrobin.	74

LISTAS DE APÉNDICES

		Página
Apéndice 1.	Medios de cultivo.	92
Apéndice 2.	Etiquetas utilizadas en los experimentos *in vitro* e *in vivo*.	94
Apéndice 3.	Brotación de los primeros tres meses de siembra y desarrollo de la epidemia.	103
Apéndice 4.	Aislados encontrados a nivel de campo en el cultivar Florido.	113
Apéndice 5.	Análisis estadísticos: Evaluación *in vitro* e *in vivo.*	117
Apéndice 6.	Extracción de ADN y Purificación del producto de PCR.	121
Apéndice 7.	Secuencias de hongos asociados a la muerte regresiva del tallo.	124
Apéndice 8.	Secuencias de Referencias.	133
Apéndice 9.	Análisis estadístico: Evaluación de la sensibilidad a AZ.	139

CAPÍTULO 1

REVISIÓN DE LITERATURA

Producción e importancia económica del cultivo de ñame

El ñame (*Dioscorea* spp.) perteneciente a la familia de las Dioscoreáceas fue de gran importancia económica en Puerto Rico entre los años 80 y principios de los 90's. Debido a diferentes plagas y enfermedades, los altos costos de producción, desastres naturales y la inhabilidad de los agricultores para competir con el producto importado, la producción en la isla ha disminuido marcadamente en las últimas décadas (EEA, 1997) (Figura 1 y 2). Según el compendio estadístico del Departamento de Agricultura de Puerto Rico, en el año 2014 la producción local fue de 5, 232,590 kg mientras que en el 1990 fue estimada en 12,454,545 kg (Figura 1). Esto representa una reducción de un 45 % en la producción local. Actualmente este cultivo aporta $ 10, 179,000 al ingreso bruto agrícola de Puerto Rico (Departamento de Agricultura, 2014). En el año 2014 el ñame alcanzó una tasa de importación de 7, 364,818 kg (Departamento de Agricultura, 2014) (Figura 2).

El mayor productor de ñame a nivel mundial es África, produciendo el 93 % de la producción global (FAOSTAT, 2013). El ñame es el segundo cultivo más importante en África en términos económicos y nutricionales, ya que aporta una excelente fuente de carbohidratos, energía, vitamina C, minerales y proteínas en la dieta de los consumidores (Raj et al., 2003).

El ñame es considerado un alimento básico ("staple crop") a nivel mundial y ocupa una de las primeras posiciones en África (FAOSTAT, 2013). Las especies de ñame de mayor importancia económica a nivel mundial son *Dioscorea rotundata, D. alata*, *D. bulbifera*, *D. esculenta* y *D. dumenterum* (Chinwuba y Odjuvwuederhie, 2006). En Puerto Rico las dos

especies de mayor importancia económica son *D. alata* y *D. rotundata* siendo esta ultima la de mayor producción y preferencia gustativa en la isla.

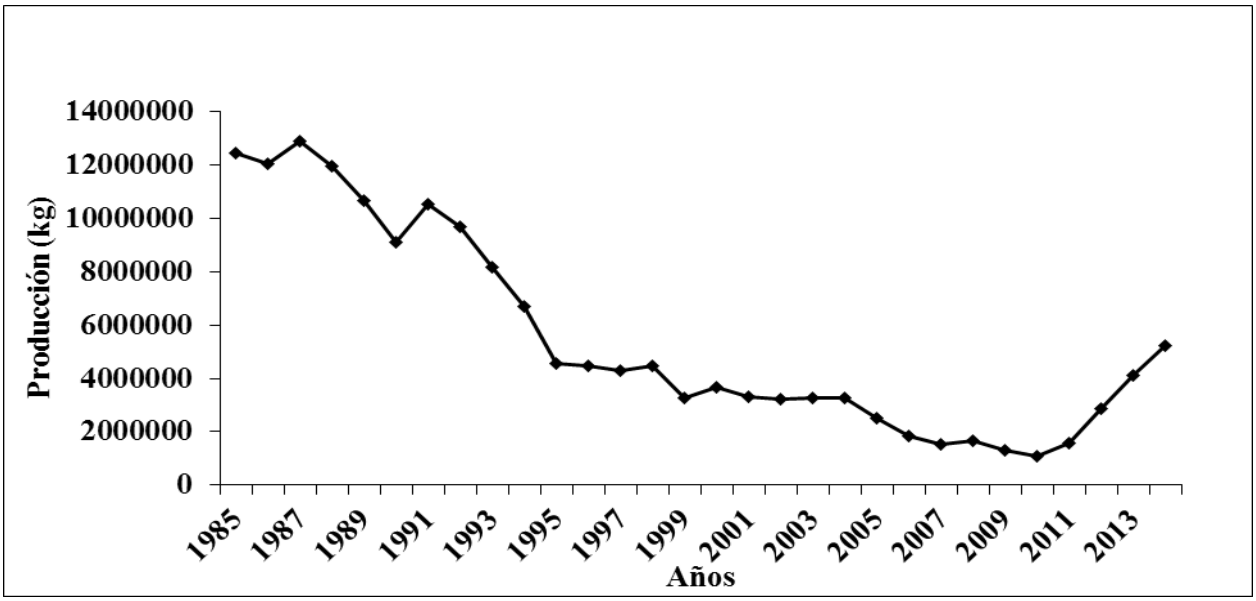


Figura 1. Producción local de ñame en Puerto Rico desde el año 1990 hasta el 2014 (Departamento de Agricultura, 2014).

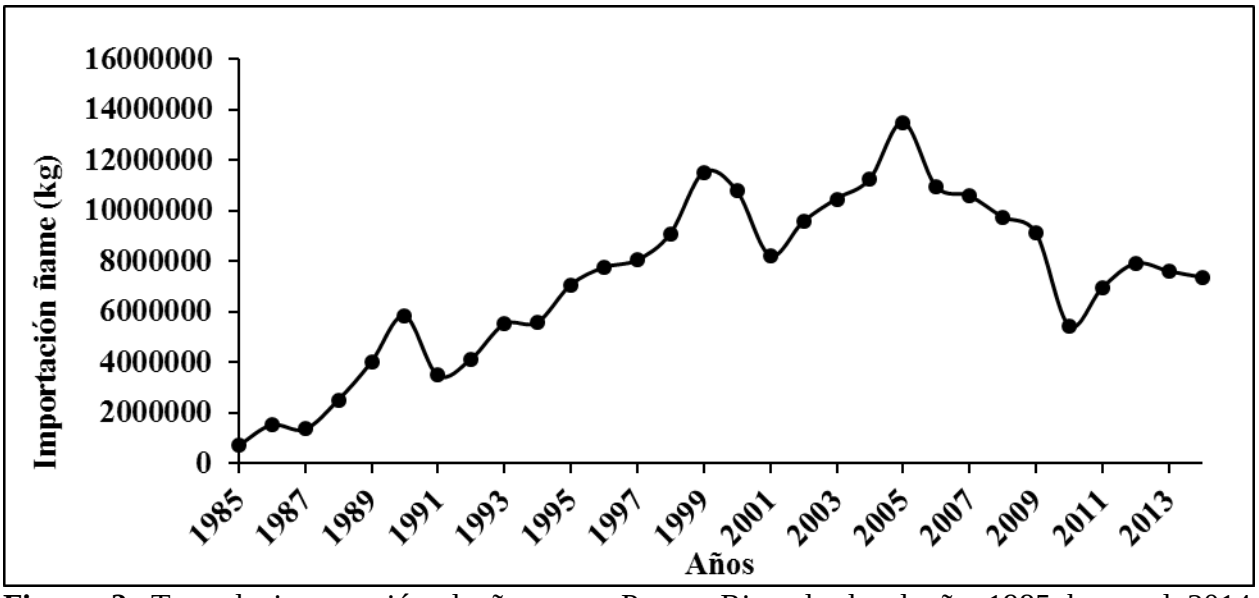


Figura 2. Tasa de importación de ñame en Puerto Rico desde el año 1985 hasta el 2014 (Departamento de Agricultura, 2014).

Origen y descripción botánica del cultivo de ñame

El ñame se origina en la zona húmeda intertropical, siendo su domesticación en Asia, África y América. Se identifica a *D. alata* y *D. esculenta* en el Sureste de Asia, mientras que *D. trífida* en la cuenca amazónica de América del Sur (Jiménez y Hernández, 2012). La planta de ñame es una angiosperma clasificada dentro de las monocotiledóneas, perteneciente al Orden *Dioscoreales* y la familia *Dioscoreácea*, la cual está compuesta de nueve géneros y posee de 600 a 900 especies (Egesi et. all, 2009). La clasificación taxonómica del ñame según Rodríguez (2000) corresponde al: Reino: Plantae División: Magnoliophyta Clase: Liliopsida Orden: Dioscoreales Familia: Dioscoreaceae Género: *Dioscorea*.

La planta de ñame se conoce por ser una especie vegetal dioica, herbácea, perenne y trepadora; caracterizada por tener tubérculos subterráneos que constituyen el principal interés de la planta tanto para consumo como para semilla y tubérculos aéreos también conocidos como bulbillos (Rodríguez, 2000). Los tallos son fibrosos, las hojas son pecioladas, sagitadas y con una nervadura reticulada, posee flores pequeñas en racimos y produce tubérculos que pueden alcanzar pesos de hasta 20 kg (Montaldo, 1991) (Figura 3). El ñame tiene un sistema radicular horizontal y poca profundidad y su desarrollo ocurre temprano en el ciclo de vida.

Los tallos no se pueden mantener firmes por lo que se necesita un soporte para el proceso de crecimiento. La forma del tallo varía en las especies como, por ejemplo; tallos redondos para *D. rotundata* y tallos alados para *D. alata* (Montaldo, 1991). La parte más importante de este cultivo lo es el tubérculo o tallo modificado, órgano donde se almacenan grandes cantidades de almidón.

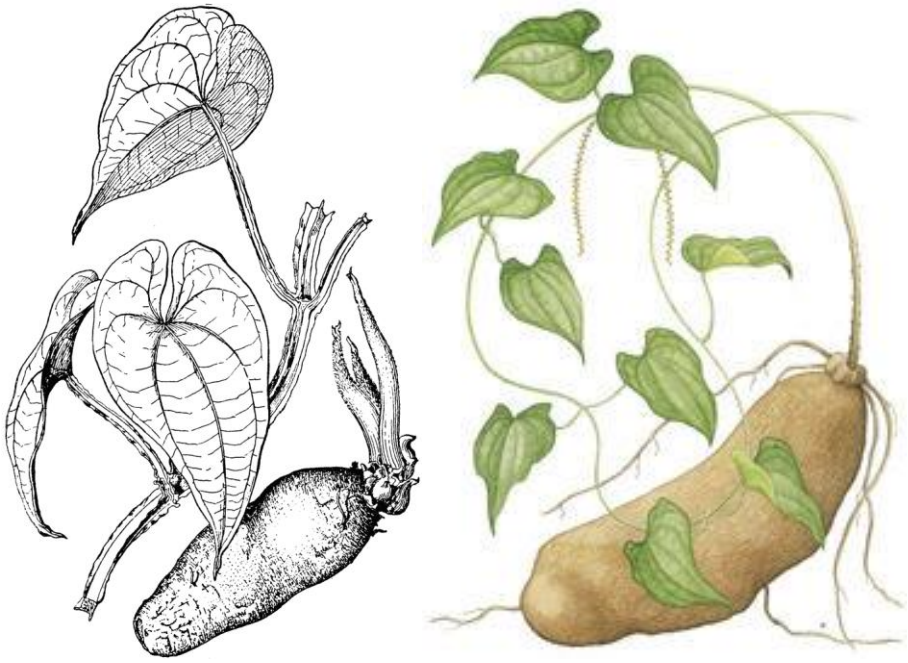


Figura 3. Morfología del ñame Florido (*Dioscorea alata*) y *D. rotundata* Tomado de: L.H. Balley Standard Cyclopedia of Horticulture, 2015.

Fenología de las plantas de ñame

El ciclo de vida del ñame es anual, dividido en cuatro etapas: latencia, emergencia, crecimiento vegetativo y producción de tubérculo y senescencia (Jiménez y Hernández, 2012). La latencia es el periodo que pasa el tubérculo en reposo antes de iniciar la brotación. El tiempo varía por cada especie, en un rango de 90 a 120 días, pero esto puede ser alterado por la luz, temperatura y humedad (Montaldo, 1991). La segunda etapa es la emergencia o conocida comúnmente como brotación, esta se caracteriza por la brotación de las yemas del tubérculo. Esta etapa puede durar de 15 a 25 días dependiendo de la especie. La tercera etapa es el crecimiento vegetativo que ocurre en los primeros tres a cuatro meses, aquí la planta desarrolla el sistema radicular y las hojas. La etapa final, la cual inicia a los tres meses del ciclo, consta de la producción y formación de tubérculos. En esta etapa las hojas producen fotosintatos que van

dirigidos a los tubérculos, lo cual puede hacer que las hojas sean más susceptibles al ataque de plagas y enfermedades (Jiménez y Hernández, 2012; Rodríguez, 2000). La planta requiere un período de 12 h de luz para un desarrollo óptimo. El ñame no tolera las temperaturas bajas y se desarrolla bien en suelos francoarenosos, sueltos, con más de 4.57 m de profundidad, con buen drenaje, buena fertilidad y pH de 5.5 a 6.0 (Botanical, 2015).

Cuando la planta entra a la fase de senescencia es porque ya se ha detenido el crecimiento del tubérculo. La planta comienza a presentar amarillamiento del follaje y posteriormente se seca. En esta etapa el tubérculo es la única parte viva de la planta, desarrollando una cutícula protectora que evita la pérdida de humedad; ocurriendo del mes séptimo al décimo, dependiendo de la cultivar (Jiménez y Hernández, 2012). La brotación de los tubérculos ya después del almacenaje señala la finalización del período de latencia y el inicio de una nueva fase vegetativa, caracterizada por el crecimiento rápido del tallo y las hojas (Rodríguez, 2000).

Importancia nutricional del cultivo

El cultivo del ñame en América tropical es sembrado por pequeños y medianos agricultores en pueblos indígenas desde la época precolombina. Constituye la principal fuente de ingresos y empleo en muchas zonas rurales del mundo (González, 2012). En cuanto a producción anual el cultivo de ñame para el año 2012 tuvo una producción mundial de 13.7 billones de dólares, siendo Nigeria el más alto productor con 8.2 billones (FAO, 2013). El ñame es considerado un cultivo con propiedades nutritivas y grandes aportaciones de carbohidratos. El ñame puede suplir el 100 % de energía y proteína, el 13 % de calcio y el 80 % de hierro que requiere un hombre adulto diariamente (Chou et al.; 2006, Raj-Bhandari et al., 2003). Es de señalar que constituye una excelente fuente de sales minerales como el calcio, el hierro y el

fósforo, contiene vitaminas A y C, así como la vitamina B1 o tiamina, importante en el crecimiento de los niños, y la vitamina B5 de importancia para el sistema inmunológico (González, 2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores nutricionales del ñame (USDA, 2013).

Nutrientes	Unidad	Valor/100g	Nutrientes	Unidad	Valor/100g
Agua	g	69.69	Potasio	mg	816
Calorías	kcal	118	Sodio	mg	9
Proteínas	g	1.53	Zinc	mg	0.24
Lípidos totales	g	0.17	Vitamina C	mg	17.1
Carbohidratos	g	27.88	Tiamina	mg	0.112
Fibra	g	4.1	Riboflavina	mg	0.032
Azúcares	g	0.50	Niacina	mg	0.552
Calcio	mg	17	Vitamina B-6	mg	0.293
Hierro	mg	0.54	Folato	mg	23
Magnesio	mg	21	Vitamina A	IU	138
Fósforo	mg	55	Vitamina E	mg	0.35

Enfermedades del ñame

El cultivo de ñame se ve afectado por diversas plagas y enfermedades, que atacan el follaje y al tubérculo en condiciones de campo y almacenaje (EEA, 1997). Los patógenos más importantes son *Curvularia* spp., agente causal de manchas necróticas circulares en el follaje de *D. alata*, *Fusarium oxysporum*, *Cercospora* sp. y *Sclerotium rolfsii* que causan marchitez vascular (Mignucci, 1988). Este último se caracteriza por la marchitez de tallos y hojas desde el ápice hasta la base de la planta, infectando el interior del tejido, teniendo en su interior una coloración rojiza. (González, 1997). Torres-López en 1986 demostró una interacción de los patógenos *Fusarium* sp., *Meloidogyne incognita* y *Pratylenchus coffeae*, causando daños a la semilla y al bejuco del ñame en Puerto Rico.

Además de enfermedades en el campo también podemos observar problemas en el almacenaje tales como la pudrición seca, la pudrición blanda y la pudrición húmeda causados por microorganismos en post-cosecha. En la pudrición seca los síntomas varían en la coloración dependiendo del patógeno que está invadiendo los tejidos. Los tubérculos se tornan duros y secos y son invadidos por otros hongos saprófitos tales como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. que posteriormente tornan el tejido marrón con márgenes amarillos (Amusa et al., 2003, Opara, 2003, Román et al., 1984). Dichos tubérculos se tornan polvorientos y se rompen en pequeñas partículas secas. *Fusarium* spp. también se ha reportado asociado a la pudrición seca del tubérculo del ñame en África (Amusa et al., 2003).

Los mayores problemas fitosanitarios en los cultivos de ñame son causados por su susceptibilidad a hongos y virus (mosaico del ñame – YMV, virus del ñame de agua) (Egesi et

al., 2007). Este último causando síntomas comunes de virus como el moteado, mosaico, elongación del bejuco y hojas de cuerda (string-like leaves) (Egesi et al, 2007).

Antracnosis del ñame: *Colletotrichum gloesporioides*

En Puerto Rico algunos de los factores que han contribuido a la disminución en la producción es la desaparición de la cultivar Florido (*D. alata*) a causa de la enfermedad conocida como la candelilla (antracnosis), los altos costos de producción y las dificultades de mercadeo (EEA, 1997).

La antracnosis es una enfermedad causada por *Colletotrichum gloesporoides* Penz. un hongo ascomiceto perteneciente a la familia Glomerellaceae. La especie *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfo: *Glomerella cingulata*) fue clasificada taxonómicamente según el Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI, 2016) dentro de: Dominio Eukaryota, Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, Orden Glomerellales, Familia Glomerellaceae, Género *Glomerella* (anamorfo: *Colletotrichum*) y especie *cingulata* (anamorfo: *gloeosporioides*). Este es un patógeno con una gran gama de hospederos, atacando a muchos cultivos de importancia económica en regiones tropicales y subtropicales (Manners et al., 2000; Waller and Brigde, 2000). Está presente probablemente en todas las regiones donde el ñame es cultivado con mayor intensidad.

El ciclo de vida de *C. gloesporioides* comienza con la producción de conidios que llegan al follaje y penetran la hoja mediante la formación de apresorios (Figura 4). Luego se observan los síntomas y la producción de acérvulos en el tejido. Los síntomas que caracterizan a la antracnosis son lesiones oscuras o necróticas, puede afectar tanto hojas, tallos y frutos (Kutama

et al., 2013). Cuando los síntomas de la antracnosis comienzan a hacerse visibles ya el hongo ha colonizado y matado las células, no es hasta este punto en que el hospedero comienza a activar las defensas de la planta, pero ya es tarde. El hongo inhibe cualquier componente que la planta envíe como forma de defensa (Agrios, 2005).

Fuentes 2015, demostró la susceptibilidad del ñame *D. alata* cv. Florido y *D. rotundanta* cv. Guinea blanco a aislados de *Colletotrichum* en Puerto Rico. Siendo la primera vez que se reporta a este último siendo susceptible a la antracnosis.

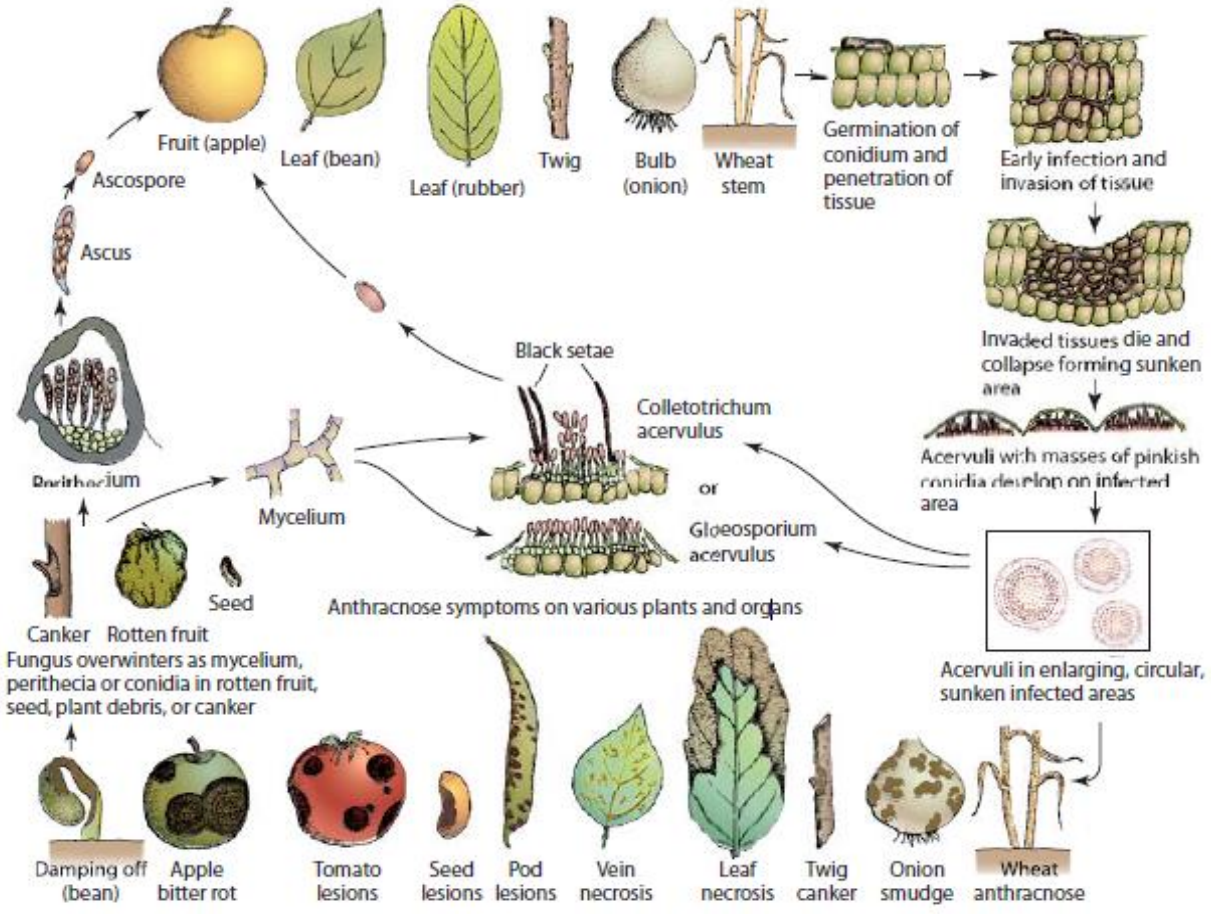


Figura 4. Ciclo de la antracnosis causado por *Colletotrichum gloesporioides* y *Glomerella cingulata* (Agrios, 2005).

Medidas de control para antracnosis

Control químico

El control de las enfermedades *Glomerella*/*Colletotrichum* depende del uso de semilla libre de enfermedad, la rotación de cultivos, el uso de cultivares resistentes cuando esté disponible, extracción y quema de material infectado y, por último, la utilización de fungicidas apropiados (Agrios, 2005). El control químico en la agricultura es ampliamente utilizado para el manejo de las enfermedades, aunque es el más costoso, ya que equivale a años de investigaciones para poder encontrar ingredientes activos eficaces contra diferentes enfermedades (Morton and Staub, 2008; Torgeson, 1967). En adicción, algunos de los químicos utilizados son causantes de contaminación al ambiente, daños a la salud y desarrollo de resistencia a patógenos (Kutama et. all, 2013). En el caso de la antracnosis en Puerto Rico no existe una amplia gama de fungicidas registrados para su manejo, solo se cuenta con el uso de estrobilurinas (Quadris®). El manejo cultural no es suficiente para el control de la antracnosis y su fuerte impacto ha llevado a que los productores de ñame adopten métodos tradicionales como la aplicación de fungicidas, muchas veces en forma exagerada para dar solución a los ataques del patógeno. En Puerto Rico, se utilizaba el fungicida Benomyl-Benlate en el 1997, éste desarrolló resistencia del patógeno reduciendo su eficacia por el uso indiscriminado (Plaguicidas Ingresos y Gastos, 1997).

Actualmente no se ha encontrado reporte que indique un control efectivo para la antracnosis en ñame. A pesar de que si hay productos químicos en el mercado para combatir antracnosis en otros cultivos agrícolas (Campo, 2011).

En condiciones *in vitro* la evaluación de fungicidas a base de cobre contra *Colletotrichum gloesporoides* en Aguacate, fueron eficientes a concentraciones de 140.9 µg/ml con el fungicida Kocide® 3000 (Everett and Timudo, 2007). Por otro lado, mancozeb (Dithane®) resultó ser más efectivo contra *Colletotrichum* sp. en condiciones de *in vitro* (Javaid et al., 2007). Feliciano, 2011 realizó una investigación la cual evaluó diferentes fungicidas de base biológica y químico, de los cuales Sonata®, Serenade Max® y fungicidas en base de cobre fueron efectivos inhibiendo el crecimiento micelial de *Colletotrichum orbiculare.* Actualmente existen 10 fungicidas registrados para controlar la antracnosis en diferentes cultivos (Tredway and Wong, 2012).

Control biológico

El uso de control biológico es una alternativa sustentable en la agricultura y ha tenido un auge en la creación de productos biológicos comerciales bajo el Instituto de Revisión de Materiales Orgánicos (OMRI siglas en inglés). Un ejemplo de control biológico en la agricultura lo es el uso de la bacteria *Streptomyces* sp. para controlar la antracnosis del ñame. Esta bacteria actúa inhibiendo la germinación de los conidios y el crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. en condiciones de laboratorio (Palaniyandi et al., 2011).

Por otro lado, el conocimiento y exploración de la biología de *C. gloeosporioides* y la naturaleza genética involucrada en su interacción con el cultivo de ñame, puede abrir el camino a la búsqueda de nuevas y efectivas herramientas de control. El uso de hongos para el control de *Colletotrichum* sp. es una alternativa, ya que la utilización de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. con concentraciones 0.4 % individuales y en combinación resultaron ser efectivas para el control de la antracnosis en fresas (Freeman et al., 2004).

Uso de cultivares resistentes

Entre las estrategias más prometedoras para el control de la antracnosis está la selección de cultivares resistentes (Amusa et al., 2003). En Puerto Rico fue introducido el cultivar Diamantes (*D. alata*) la cual el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica reporta como resistente a la antracnosis (Aguilar, 1992). Estudios recientes demostraron la susceptibilidad de este cultivar a varias especies de *Colletotrichum* en la isla, Fuentes 2015, identificó por primera vez 9 especies de este hongo en ñame en Puerto Rico. Las especies de este hongo fueron identificadas como; de *D. alata* y *D. rotundata* las más susceptibles a antracnosis encontrando a; *C. alatae, C. aotearoa, C. cliviae, C. fructicola, C. gloeosporioides, C. ignotum, C. siamense, C. tropicale, C. theobromicola,* y *C. truncatum.*

En Nigeria, Costa Rica y Barbados se ha evaluado la resistencia del banco de germoplasma de ñame a la antracnosis, bajo condiciones de campo en lotes en donde la enfermedad se manifiesta en forma endémica, teniendo como resultado varios genotipos con resistencia a la enfermedad (Campo, 2011). Sin embargo, su uso a nivel comercial no se ha establecido.

El uso de cultivares resistentes para el manejo de las enfermedades es una estrategia eco-amigable y deseada por los agricultores en diferentes cultivos. Esta alternativa se podría desarrollar para producir cultivares resistentes a la antracnosis de ñame en Puerto Rico. En Puerto Rico se dejó de sembrar la cultivar Florido (*D. alata*) y se cambió a Habanero (*D. rotundata*) ya que este es resistente a la antracnosis (González, 1989).

Este cultivo posee grandes ventajas en cuanto a su fenología ya que puede estar en campo de 6 a 9 meses según su especie, y este puede tener diferente forma de siembra como por

ejemplo montículos o bancos (González, 2006). Además, posee un periodo de latencia (dormancia) de dos a cuatro meses en el cual este se puede mercadear.

CAPÍTULO 2

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE FUNGICIDAS ORGÁNICOS Y CONVENCIONALES *IN VITRO* E *IN VIVO* PARA EL MANEJO DE ENFERMEDADES FOLIARES EN ÑAME (*DIOSCOREA ALATA* CV. DIAMANTES)

INTRODUCCIÓN

El cultivo del ñame (*Dioscorea alata* L.) se ve afectado por diferentes enfermedades foliares, de las cuales antracnosis o comúnmente conocida por los agricultores como candelilla es la más importante (EEA, 1997; Mignucci et al., 1988). Debido a esta enfermedad los agricultores pueden enfrentar pérdidas de un 50 % hasta un 90 % en los rendimientos (González, 2006). Esto causó que los agricultores dejaran de producir el cultivar Florido (*D. alata*) y se movieran a producir Guinea blanco (*D. rotundata*) que mostraba resistencia a la candelilla (Tabla 2) (Mignucci et al., 1988). El cultivo del ñame se considera el segundo cultivo de raíz más importante en África ("staple food"), seguido de la yuca (Delebo, 2008; Raj et al., 2012). Este puede suplir el 100 % de energía y proteína, el 13 % de calcio y el 80 % de hierro que requiere un hombre adulto diariamente (Chou et al.; 2006, Raj-Bhandari et al., 2003).

Las lesiones ocasionadas por la candelilla que comúnmente se observan son; puntos necróticos, muerte regresiva y defoliación (Manners et al., 2000). Un complejo de nuevas especies de *Colletotrichum* descritas como; *C. alatae, C. aotearoa, C. cliviae, C. fructicola, C. ignotum, C. siamense, C. tropicale, C. theobromicola,* y *C. truncatum* se han relacionado a este patosistema que afecta a los productores de ñame en Puerto Rico (Fuentes, 2015). La enfermedad se presenta en el campo cuando coinciden varios factores, entre estos se destacan, la susceptibilidad de la planta, el aumento de la población del patógeno y la alta humedad relativa,

fuertes precipitaciones, altas temperaturas, vientos fuertes y alta intensidad de luz (Mignucci, et al., 1985).

El manejo de esta enfermedad ha sido ampliamente estudiado, recomendando las siguientes medidas; uso de semilla libre de patógenos, la utilización de fungicidas orgánicos o convencionales y el uso de cultivares resistentes (Amusa et al., 2003). Estudios anteriores en Puerto Rico evaluaron la utilización de productos químicos tales como; Benomyl, Captafol y Tiabendazole para combatir la antracnosis en campo, siendo el Benomyl como aplicación foliar cada cuatro semanas el que mejor efectividad obtuvo (Mignuci et al., 1988). Sin embargo, con el tiempo se detectó el desarrollo de resistencia de hongos a este producto y actualmente está fuera del mercado de Puerto Rico (Anónimo, 2002; Plaguicidas Ingresos y Gastos, 1997).

En Puerto Rico, al día de hoy, no existen productos de origen sintético u orgánico para manejar esta enfermedad a nivel de campo, con la excepción del fungicida sistémico Quadris® (estrobilurinas). Este fungicida es conocido por atacar directamente la respiración mitocondrial de los hongos mediante la inhibición de la quinona (QoI), perteneciente a la familia de la estrobilurinas (Clough, 1993). A este fungicida también se le asocia el desarrollo de resistencia ya que en el código del comité de acción de resistencia a fungicidas (FRAC) demuestra ser uno de alto riesgo (FRAC, 2016).

Debido a esta situación se debe implementar otras medidas de control para tener un manejo integrado de enfermedades efectivo en ñame en Puerto Rico. Es por esto que los objetivos de esta investigación son la evaluación de productos potenciales con fungicidas certificados orgánicos y convencionales para el manejo de enfermedades foliares en ñame para dos especies de *Colletotrichum; C. alatae* y *C. gloesporioides* de manera *in vitro* e *in vivo*.

Tabla 2. Resistencia de cultivares de ñames a antracnosis (Mignucci, et al., 1988).

Cultivares	Reacción a la antracnosis
Florido	HS
Forastero	MS
Binugas	R
Gunung	R
Kinampay	R
Purmay	R
Gemelos	HS
Moresby	HS
Guinea Blanco	R
Guinea Negro	R
	Claves: R= resistente; S= susceptible; HS= altamente susceptible; MS= moderadamente susceptible

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de hongos utilizados en la evaluación *in vitro*

Colletotrichum alatae y *C. gloesporioides* fueron colectados de fincas productoras de ñame, en los pueblos de Utuado y Moca respectivamente (Fuentes, 2015). Los organismos fueron inoculados en agar de papa y dextrosa 39 % (w/v) (PDA; Difco Lab, Detroit, MI) (Apéndice 1) bajo luz fluorescente a 22˚C. Cultivos monospóricos fueron obtenidos a partir de la muestra inicial y fueron utilizados para los experimentos *in vitro* (Goh, 2009; Choi et al., 2009). La concentración de conidios de ambos aislados fue ajustada a 10^6 para todos los experimentos (Feliciano, 2011).

Preparación y diluciones de los materiales para los experimentos de *in vitro* e *in vivo*

Fungicidas Certificados OMRI (Instituto de revisión de materiales orgánicos). Aceite de neem al 70 % (Trilogy®) y extracto de la planta de falopia o "giant knotweed" (Regalia® SC) fueron comprados en Certis (EPA No. 70051-2, MD) y Marrone™ Bio Innovations (EPA No. 8403-3, CA), respectivamente. Una solución inicial de 1000 µg/ml fue preparada para los experimentos *in vitro* para ambos fungicidas. La solución se pasó a través de un filtro estéril de un poro de 0.2 µm y luego uno de 0.45 µm (VWR®, Syringe Filters, USA) con una jeringa de 10 cc estéril (VWR®, Syringe, USA) para ser esterilizada (Feliciano, 2011). Las concentraciones utilizadas fueron obtenidas de la solución inicial en un rango de 1 a 500 µg/ml (Tabla 2).

Fungicidas convencionales. Los productos químicos comerciales que fueron evaluados de manera *in vitro* e *in vivo* son Kocide® 3000 (i.a. Hidróxido de cobre al 46.1 %, DuPont TM, EPA No. 352.662), Fontelis™ (i.a. Pentiopirad al 20.4 %, DuPont TM, EPA No. 352-834), Chlorothalonil 720 (i.a. clorotalonil al 54.0 %, Chem Nut Inc, EPA No. 60063-7-37686), Switch®62.5 WG (i.a. Cipodrinil y Fludioxonil al 37.5 y 25.0 %, Syngenta®, EPA No. 100-953), Kphite® 7LP (i.a. ácido fosfórico al 56.0 %, Plant Food Systems, EPA No. 73806-FL-001) y Quadris® utilizado como control positivo (i.a. estrobilurinas al 22.9 %, Syngenta®, EPA No. 100-1098) (Apéndice 2). Una solución inicial de 1000 µg/ml fue preparada para el experimento *in vitro* para todos los fungicidas convencionales evaluados. La solución se pasó a través de un filtro estéril de un poro de 0.2 µm y luego uno de 0.45 µm (VWR®, Syringe Filters, USA) con una jeringa de 10 cc estéril (VWR®, Syringe, USA) para ser esterilizada (Feliciano, 2011). Las concentraciones utilizadas fueron obtenidas de la solución inicial en un rango de 1 a 500 µg/ml (Tabla 3). En los experimentos *in vivo* se utilizaron las concentraciones recomendadas por el

manufacturero (Tabla 4) y los fungicidas fueron aplicados de la misma forma que los fungicidas certificados OMRI.

Evaluación *in vitro* de la inhibición del micelio de dos aislados de *Colletotrichum*

El efecto antifúngico de los productos certificados OMRI y convencionales fueron evaluados con un ensayo colorimétrico utilizado para determinar la absorbancia (450 nm) del crecimiento micelial utilizando microplatos (Nunc-Immuno TMPlate, USA). Las soluciones constaron de 100 µl de solución de conidios (10^6 conidio/ml), 400 µl de caldo de dextrosa de papa (PDB; Difco Lab.) luego se le añade la cantidad requerida para cada fungicida (Tabla 3) más agua destilada estéril (DDiH_2O) para un volumen final de 1000 µl. La mezcla es llevada al vortex por 5-10 segundos, luego se colocarán 100 µl de la solución a ocho fosas (réplicas por cada tratamiento) del micro plato que sirven como las réplicas de los tratamientos en el diseño experimental. La solución de los conidios no tratados fue utilizada como control negativo mientras que el positivo fue los conidios con el fungicida Quadris® (Syngenta, Greensboro, NC).

El microplato de 96 fosas fue dividido en dos partes; la parte experimental (las 48 fosas del lado izquierdo) que tenía todos los tratamientos con los conidios del hongo y el lado control (las 48 fosas del lado derecho) que tenía todos los tratamientos sin los conidios (Figura 5). El lado control sirve como un control interno de los experimentos para conocer el crecimiento neto del hongo a través de la emisión de color del micelio y no el color emitido por los demás componentes en la solución (Feliciano, 2011). La absorbancia fue medida con un fotómetro (Multiskan™ FC Microplate Photometer) con un filtro de 450 nm (Feliciano, 2011).

Para determinar el crecimiento micelial neto, se tomaron las medias de las absorbancias de las mezclas sin los conidios (las 48 fosas del lado derecho) y esta se le restó a la absorbancia

de su correspondiente tratamiento en el lado experimental. El valor final fue transformado en el porcentaje de inhibición de micelio (mgi) con respecto al control negativo, con la siguiente formula:

$$mgi = (1-A_n/A_0) *100$$

donde A_n es la absorbancia de la muestra y A_0 es la absorbancia media del control negativo (no tratado). Una vez añadidos los tratamientos al microplato el mismo se incubó durante 48 h a 22°C y bajo luz constante. El experimento fue repetido dos veces con ocho réplicas por tratamiento.

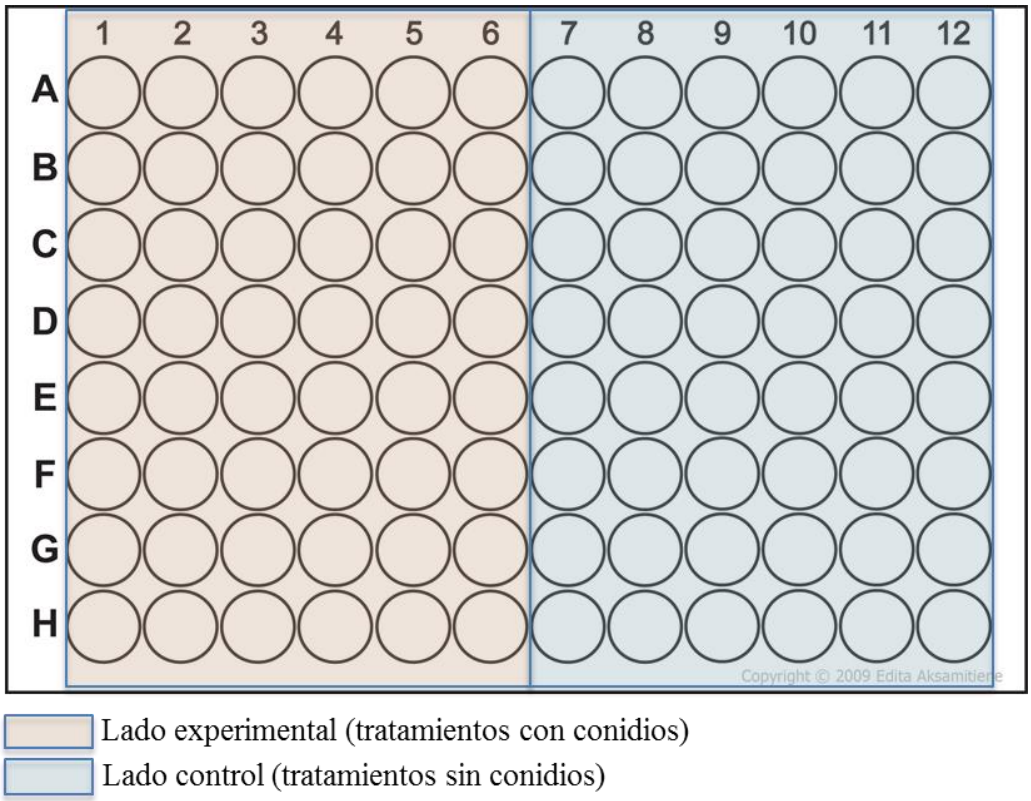


Figura 5. Diagrama utilizado para la identificación de las partes a tratar con conidios y sin conidios en el ensayo colorimétrico.

Evaluación *in vivo* de fungicidas para el manejo de enfermedades foliares

Las semillas fueron obtenidas de la Estación Experimental Agrícola en Isabela de experimentos anteriores. Esta investigación se realizó en la Estación Experimental de Isabela, de la Universidad de Puerto Rico (Figura 6). La Estación está ubicada a una altura de 128,016 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 84°F y una precipitación anual de 1, 734,82 centímetros (US Climate data, 2015). En la región de Isabela, los vientos soplan mayormente del este-noreste a una velocidad anual promedio de 8.4 MPH. Los vientos soplan a mayor velocidad durante el mes de julio con un promedio de 9.5 MPH. Por otro lado, octubre es el mes en que menos vientos soplan con una frecuencia de calma de 18.2 % y una velocidad promedio mensual de 6.7 MPH. En el invierno el viento sopla en el área norte de forma regular entre 8 y 15 MPH (Anónimo, 2008).

Debido a problemas fitosanitarios con la semilla de ñame del cultivar Florido y altamente susceptible a la antracnosis (cv. Florido) (CAPÍTULO 3) se procedió a utilizar el cultivar Diamantes para llevar a cabo la evaluación de los fungicidas a nivel de campo. Se realizó un diseño de bloques completos aleatorizado (DBCA) con cuatro repeticiones. El experimento consistió de 10 tratamientos asignados aleatoriamente en cada bloque. Cada tratamiento dentro de cada bloque estaba compuesto por 4 hileras con 10 plantas cada una, para un total de 160 plantas por tratamientos (Figura 8). El cultivar Florido se sembró como borde para aumentar la presión de enfermedad, ya que este es más susceptible a la antracnosis, mientras que el cultivar Diamantes fue seleccionado para evaluar los fungicidas, ya que es el más utilizado de la especia *D. alata* a nivel comercial. Los ñames del cultivar Florido se sembraron el 8 de marzo mientras que los Diamantes el 7 de abril y cosechados en diciembre.

Se tomaron datos de brotación durante los primeros tres meses luego de la siembra, y se realizaron aislamientos de tejido infectado de la cultivar Florido y Diamantes de manera aleatoria, para así detectar la presencia de *Colletotrichum* spp. u otros agentes patógenos foliares presentes en las parcelas experimentales (Apéndice 3). Las plantas fueron fertilizadas los primeros dos meses con una formulación de 15-5-10, y al cuarto mes se utilizó la formulación 10-5-20; ambos fertilizantes son de forma granular y la dosis utilizada fue basada en la recomendación del conjunto tecnológico de raíces y tubérculos (EEA, 1997).

En los experimentos *in vivo* se utilizaron las concentraciones recomendadas por el manufacturero (Tabla 4) y los fungicidas fueron aplicados con una bomba de aspersión de 15 litros (SOLO, 425® Backpack Sprayer, USA) (Figura 7-B) a una presión de 90 psi. El fungicida Regalia® se evaluó en dos concentraciones, 2 cuartillos/acre y 4 cuartillos/acre. Los fungicidas fueron aplicados de forma foliar en un volumen de 9 litros de agua utilizando la dosis media de lo establecido en la etiqueta del producto. De las cuatro hileras (10 pantas c/u) dentro de cada parcela se trataron las dos hileras del centro y las de los extremos se utilizaron como borde para evitar contaminación cruzada con los fungicidas. Los fungicidas fueron aplicados en un intervalo de 14 días comenzando el día 27 de julio y culminando 30 días antes de la cosecha.

Severidad de la enfermedad

La severidad de la enfermedad fue evaluada cada dos semanas entre aspersiones durante la fase de crecimiento del cultivo. Se utilizó la escala desarrollada por Egesi (2007) con las siguientes modificaciones; de 1 al 6 (1= 0 %, 2 = 1 – 20 %, 3= 21 – 30 %, 4= 31 – 40 %, 5= 41 – 50 %, 6= > 50 %) para estimar la severidad.

Figura 6. Localización del predio donde se realizó la investigación en la Estación Experimental Agrícola de Isabela de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez (18.464504, -67.053931).

Tabla 3. Concentraciones de fungicidas utilizadas en el ensayo colorimétrico *in vitro*.

Fungicidas	**Concentración *in vitro*[1]**	**Referencias**
Quadris® (AZ)	10[2]	Kunova et al., 2014
Regalia®	1, 5, 10 y 20	Konstantinidou-Doltsinis et al., 2006
Fontelis™	12.5, 50, 100 y 200	Yanase et al., 2013
Kocide®3000	2, 4, 8 y 10	Ponmurugan et al., 2006
Chlorothalonil®720	22.5, 45, 90 y 180	Issiakhem and Bouznad, 2010
Trilogy®	3, 10, 140 y 380	Hagan and Akridge, 2007
K-phite®7LP	1, 5, 50 y 100	Amiri et al., 2008
Switch®62.5 WG	10, 50, 100 y 150	Debode et al., 2013

[1] Concentraciones en µg/ml.
[2] Se utilizó SHAM a 100 µg/ml como inhibidor de la ruta alterna.

Tabla 4. Tratamientos fúngicos y concentraciones utilizadas a nivel *in vivo*.

Fungicidas	**Ingrediente Activo**	**Dosis Aplicación/acre**[1]	**Manufacturero**
K-phite®7LP	56 % Mono and di-potassium salts of Phosphorus acid	1892.71 ml	Plant Food System
Fontelis™	20.4 % Penthiopyrad	591.47 ml	DuPont®
Kocide®3000	46.1 % Copper hydroxide	566.99 g	DuPont®
Trilogy®[2]	70.0 % Neem oil	946.35 ml	Certis, USA
Regalia®[2]	5.0 % *Reynoutria sachalinensis*	2365.88 ml	Marrone Bio Innovations
Switch®62.5 WG	37.5 % Cyprodionil y 25.0 % Fludioxonil	369.67 ml	Sygenta®
Chlorothalonil 720®	54.0 % Chlorothalonil	473.18 ml	Chem Nut Inc.
Quadris®	22.9 % Azoxystrobin	317.92 ml	Sygenta®

[1]Los fungicidas fueron aplicados cada 14 días siguiendo las recomendaciones del manufacturero.
[2]Certificados OMRI.

Figura 7. (A) Materiales utilizados para las pruebas colorimétricas *in vitro*, (B) bomba de aspersión (SOLO, USA) de espalda para la aplicación de fungicidas y (C) trabajador agrícola encargado de las aperciones de los fungicidas en campo.

D. alata cv. Florido										
*T – 10	T – 9	T – 2	T – 8	T – 1	T – 4	T – 6	T – 7	T – 3	T – 5	B -IV
D. alata cv. Florido										
*T – 3	T – 9	T – 4	T – 6	T – 8	T – 1	T – 10	T – 2	T – 7	T – 5	B-III
D. alata cv. Florido										
*T – 1	T – 9	T – 8	T – 3	T – 10	T - 2	T – 4	T – 5	T – 7	T – 6	B-II
D. alata cv. Florido										
*T – 5	T – 3	T – 8	T – 9	T – 4	T – 2	T – 1	T - 6	T – 10	T – 7	B-I
D. alata cv. Florido										

**D. alata* cv. Diamantes

Figura 8. Diseño experimental DBCA para la evaluación de fungicidas a nivel de campo, utilizando dos cultivares de *D. alata*; Diamantes y Florido.

Análisis estadísticos

En el ensayo colorimétrico *in vitro* se evaluaron cuatro concentraciones (tratamientos) para cada fungicida con ocho repeticiones. Cada ensayo fue repetido dos veces. Se realizaron seis análisis de varianza (ANOVA) y las concentraciones de cada fungicida fueron comparadas por un análisis de diferencias mínimas significativas (LSD). Los datos *in vivo* utilizando un DBCA, con cuatro bloques, 10 tratamientos (4 hileras por tratamiento) fueron igualmente analizados estadísticamente por un análisis de varianza (ANOVA) y los tratamientos fueron comparados por un análisis de diferencia significativa (LSD) con el programa de análisis estadístico InfoStat® Versión 2015 (InfoStat, FCA, Córdova Argentina). Las hileras del centro fueron las evaluadas con los fungicidas y el desarrollo de la enfermedad (AUDPC). Se realizaron diagramas de dispersión para conocer el coeficiente de correlación (R^2) entre el AUDPC y los rendimientos.

RESULTADOS

Certificados OMRI. En los ensayos colorimétricos i*n vitro,* Trilogy® no actuó como inhibidor del crecimiento micelial de *C. alatae* ni *C. gloesporioides* en todas las concentraciones evaluadas. Las concentraciones 3, 10 y 380 µg/ml promovieron el crecimiento micelial de *C. alatae* (Figura 9-A). Regalia® inhibió el crecimiento micelial de ambos aislados en más de un 40 % a una concentración de 20 µg/ml (Figura 10- A-B). Mientras que, para las concentraciones de 1, 5 y 10 µg/ml con el hongo *C. alatae* este mismo producto actuó como un promotor de crecimiento (Figura 10-A).

A nivel de campo ninguno de los dos fungicidas, Trilogy® y Regalia®, presentaron una reducción en la severidad de la enfermedad (AUDPC) o tener algún efecto en los rendimientos

(Tabla 5). Regalia® fue evaluado a diferentes concentraciones (dosis promedio y mayor dosis según la etiqueta), pero ninguna tuvo diferencias significativas con respecto al control no tratado o diferencias entre las concentraciones evaluadas.

Fungicidas convencionales. En los ensayos colorimétricos i*n vitro,* Kphite®7LP no actuó como inhibidor del crecimiento micelial de *C. alatae* ni de *C. gloesporioides* para todas las concentraciones evaluadas. Para *C. alatae* la concentración de 100 µg/ml inhibió el crecimiento micelial en > 30 % (Figura 11-A). Fontelis™ presentó más de un 50 % de inhibición para todas las concentraciones evaluadas en ambas repeticiones (Figura 12- A). Con el aislado de *C. gloesporioides*, la concentración de 12.5 µg/ml promovió su crecimiento, mientras que las concentraciones mayores (50, 100 y 200 µg/ml) tuvieron > 40 % de inhibición (Figura 12-B). Para el fungicida Kocide®3000 se observó que a mayor concentración mayor es el porcentaje de inhibición para ambos aislados, presentando una relación dosis-respuesta positiva (Figura 13 A-B). El fungicida Switch®62.5 WG presentó más de 80 % de inhibición del crecimiento micelial de *C. alatae* en todas las concentraciones evaluadas, en ambas repeticiones. La respuesta de *C. gloesporioides* fue diferente a *C. alatae* presentando una reducción de hasta 63 % del crecimiento micelial en todas las concentraciones evaluadas (Figura 14 A-B). Chlorothalonil® en todas las concentraciones tuvo una inhibición > 90 % para *C. alatae*, mientras que, para el *C. gloesporioides* una inhibición > 60 % (Figura 15 A-B).

En los experimentos de campo se observó una diferencia significativa (P> 0.05) en cuanto a la variable de enfermedad evaluada mediante el análisis del área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (AUDPC) para el fungicida Switch®62.5 WG y el control positivo (AZ) en comparación al control no tratado (Tabla 5). El último dato severidad evaluado fue el día 22 de octubre de 2015.

En términos de la variable rendimientos no se observó diferencias significativas entre los tratamientos. Se observaron diferencias significativas entre Switch®62.5 WG y Kocide®3000 pero no con respecto al control no tratado (Tabla 5).

Aislados encontrados en los muestreos de campo

Hojas con tejido sintomático fueron seleccionadas para identificar patógenos asociados al cultivo. De seis muestreos aleatorios se aislaron 35 hongos de la cultivar Florido. De los cuales 25 resultaron ser del género *Fusarium*, 3 de *Colletotrichum*, 5 *Curvularia*, 1 *Pestalotia* y 1 *Aspergillus* (Apéndice 4). Mientras que para la cultivar Diamantes se recolectaron 10 hongos de los cuales 9 fueron *Fusarium*, y 1 del genero *Colletotrichum*. Además, se aislaron 5 bacterias correspondientes a la cultivar Diamantes (Tabla 5). Las bacterias aisladas fueron descritas de acuerdo al color de las colonias, los márgenes, elevación, la forma y reacción en la tinción Gram (Fisher Science Education, Cat. No. 525344) Además, se le realizaron pruebas de reacción a KOH al 3 % (Tabla 5).

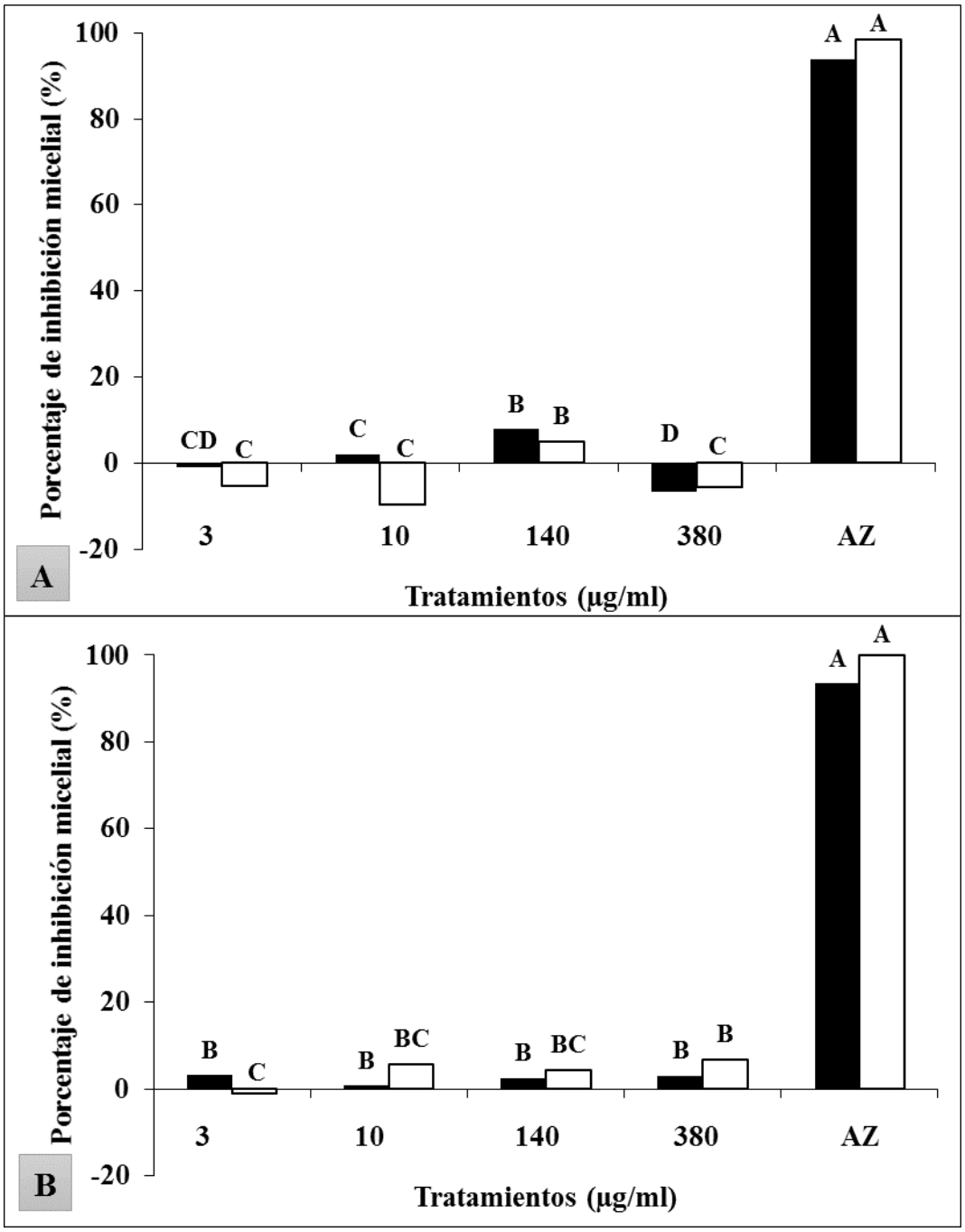


Figura 9. **Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Trilogy® para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B).** Barras color negro son el experimento uno y la blanca el experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren significativamente (p = 0,05).

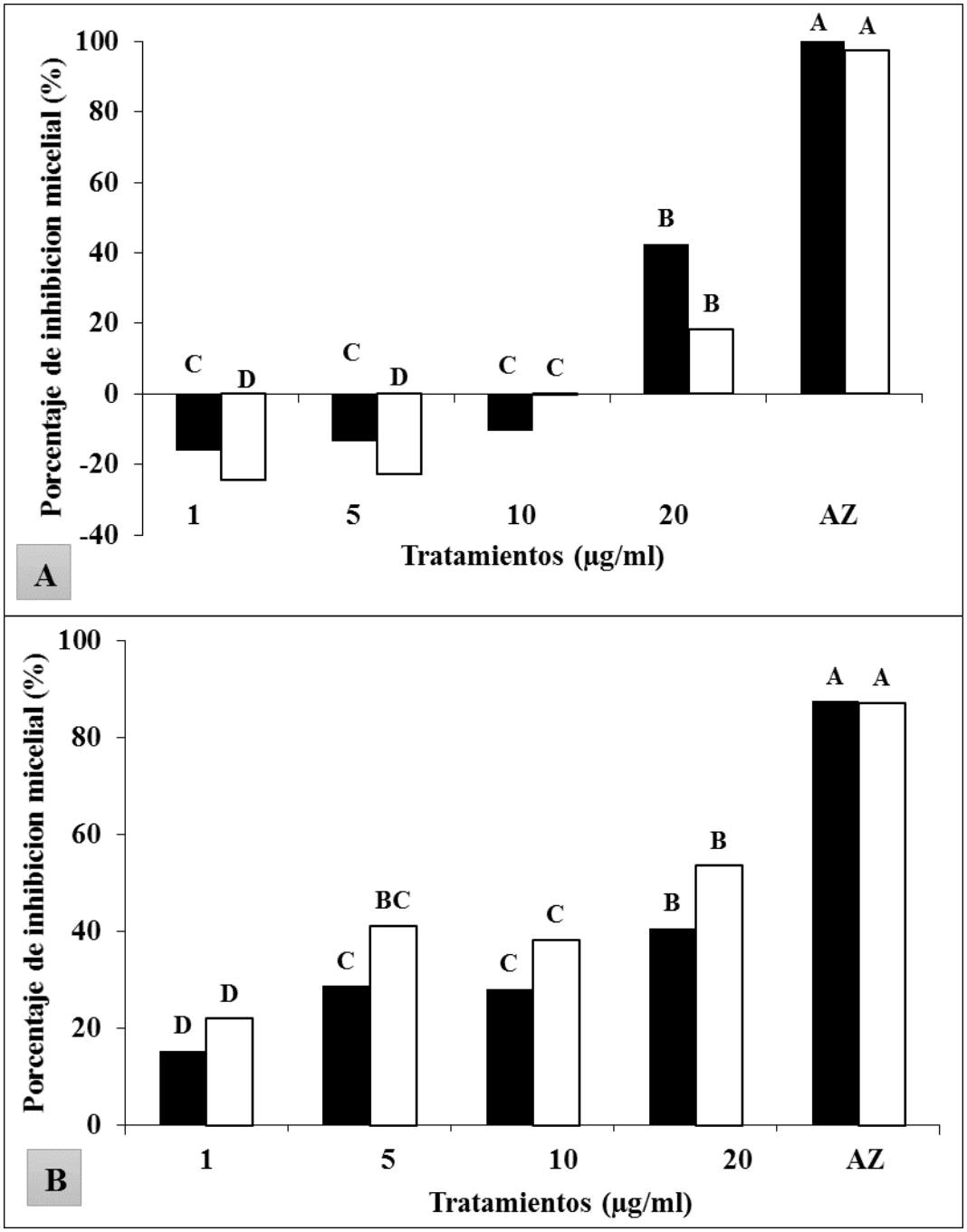


Figura 10. **Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Regalia® para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B).** Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren significativamente (p = 0,05).

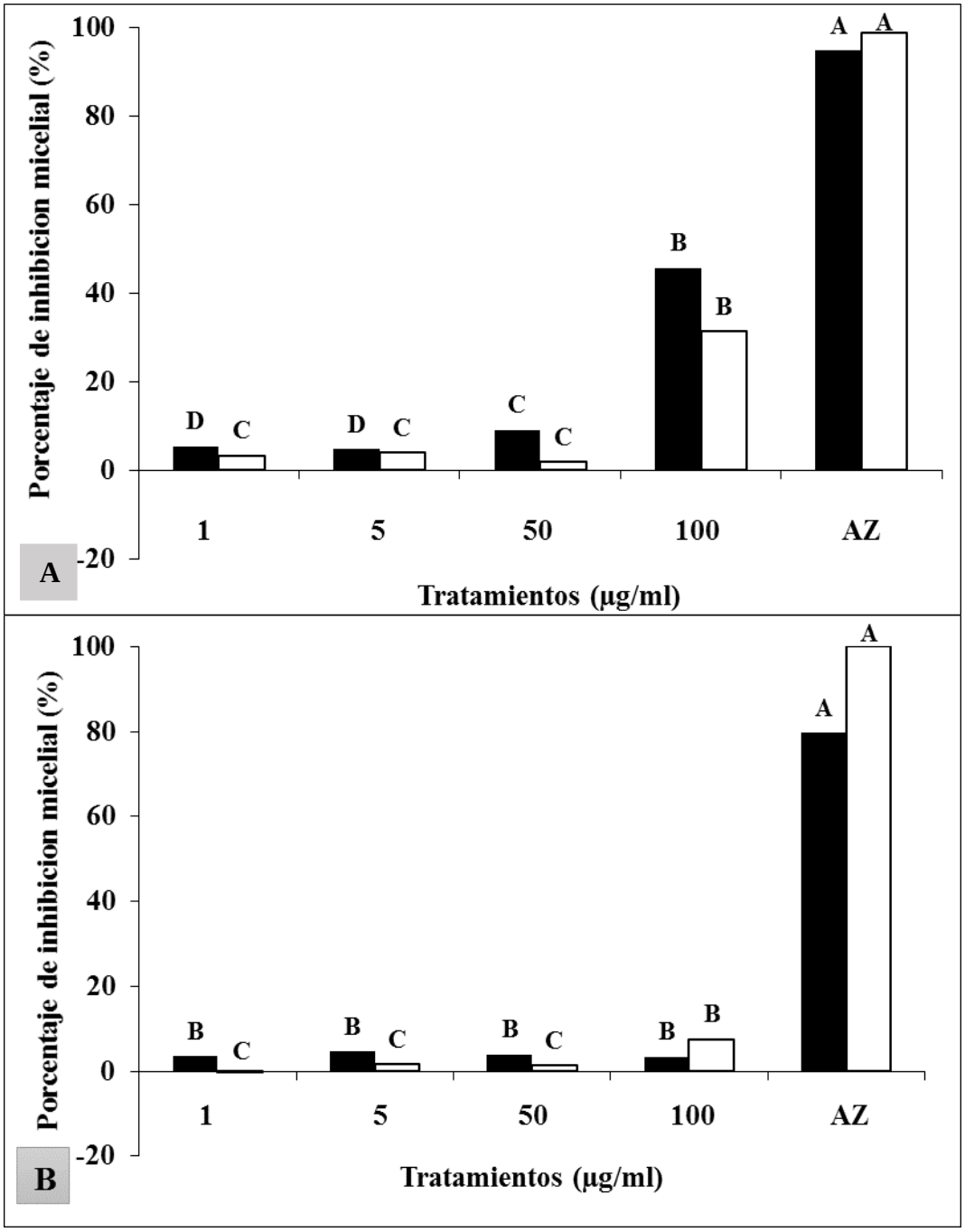


Figura 11. **Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Kphite®7LP para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B).** Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren significativamente (p = 0,05).

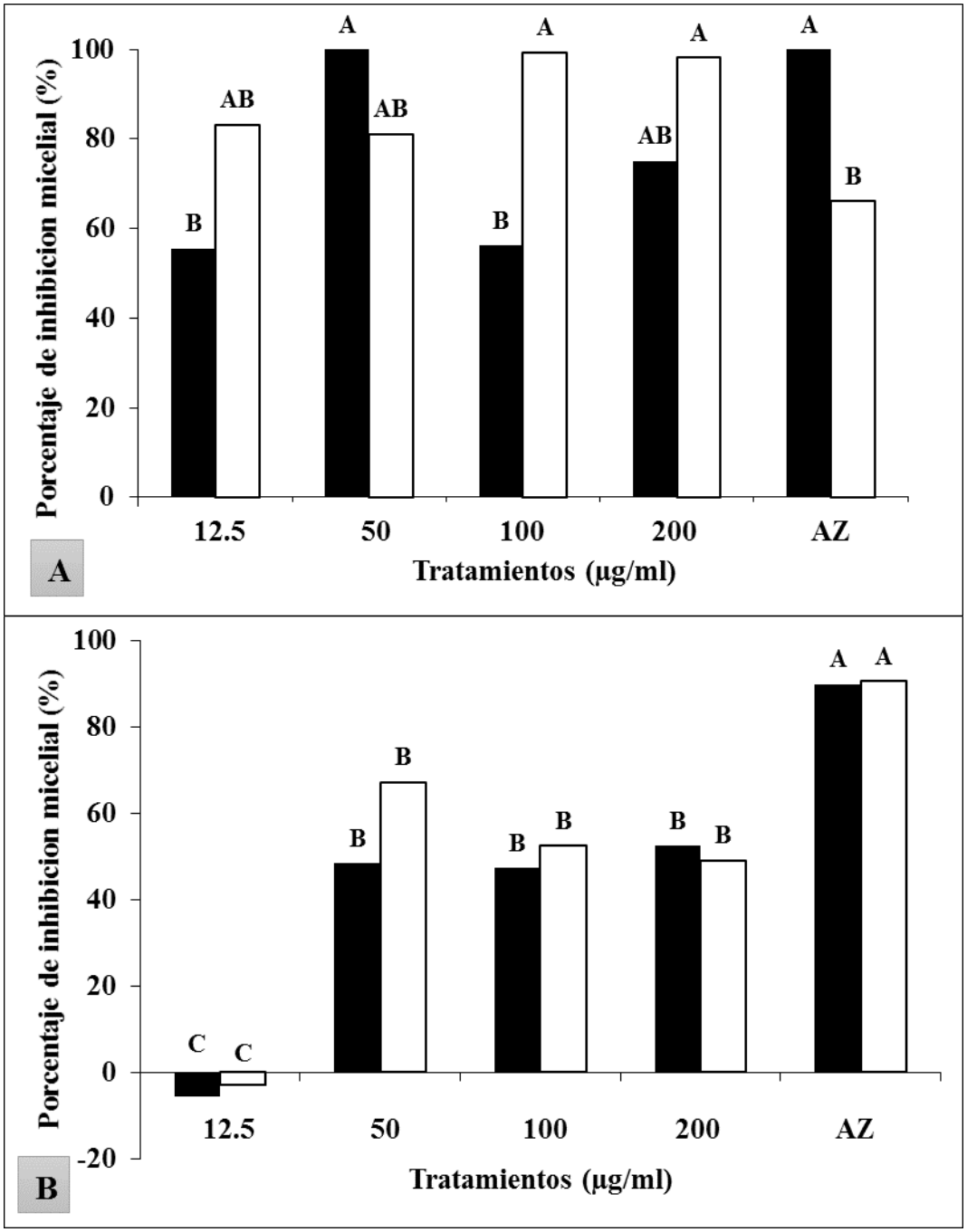


Figura 12. **Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Fontelis™ para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B).** Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren significativamente (p = 0,05).

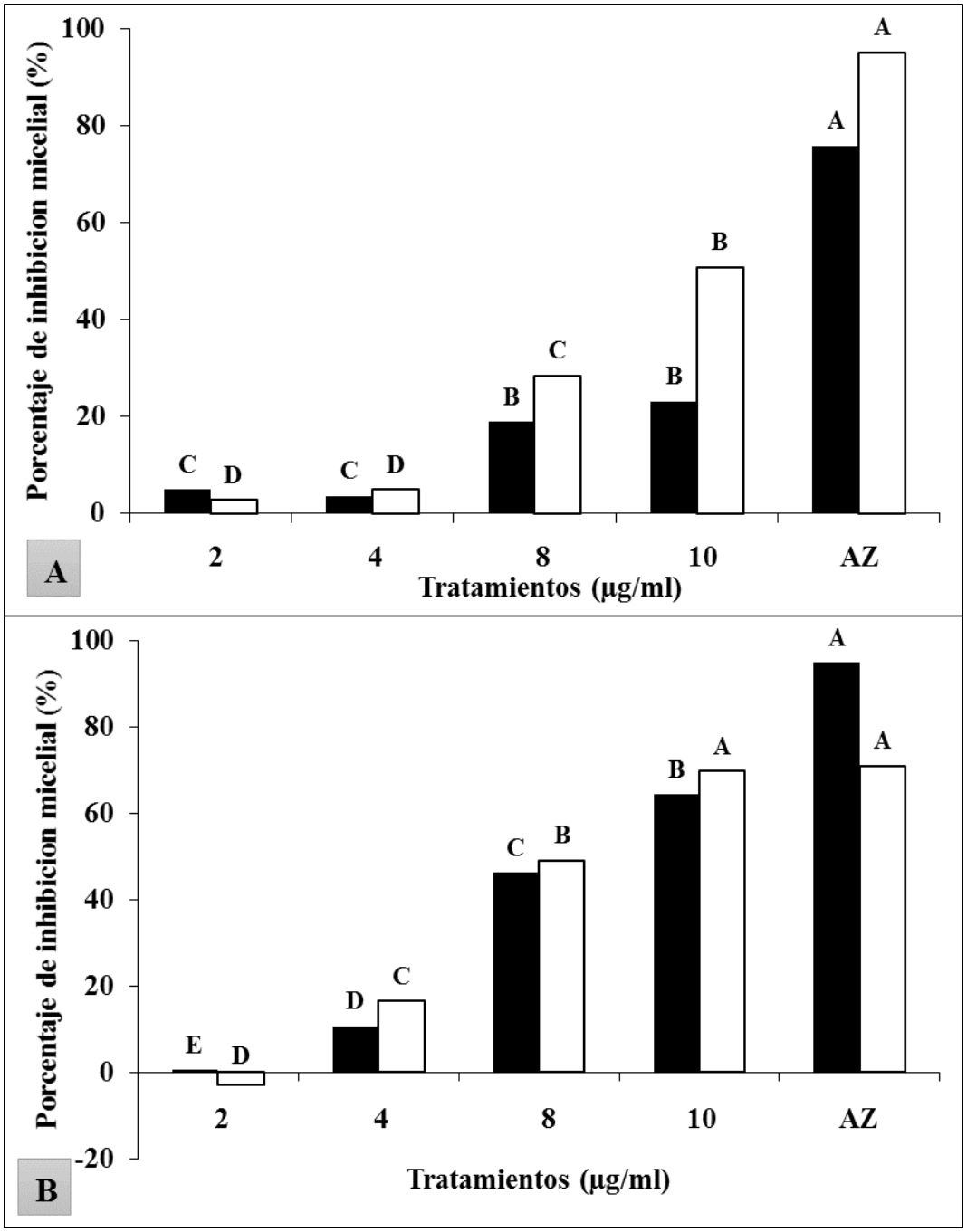


Figura 13. Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Kocide®3000 para los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B). Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren significativamente (p = 0,05).

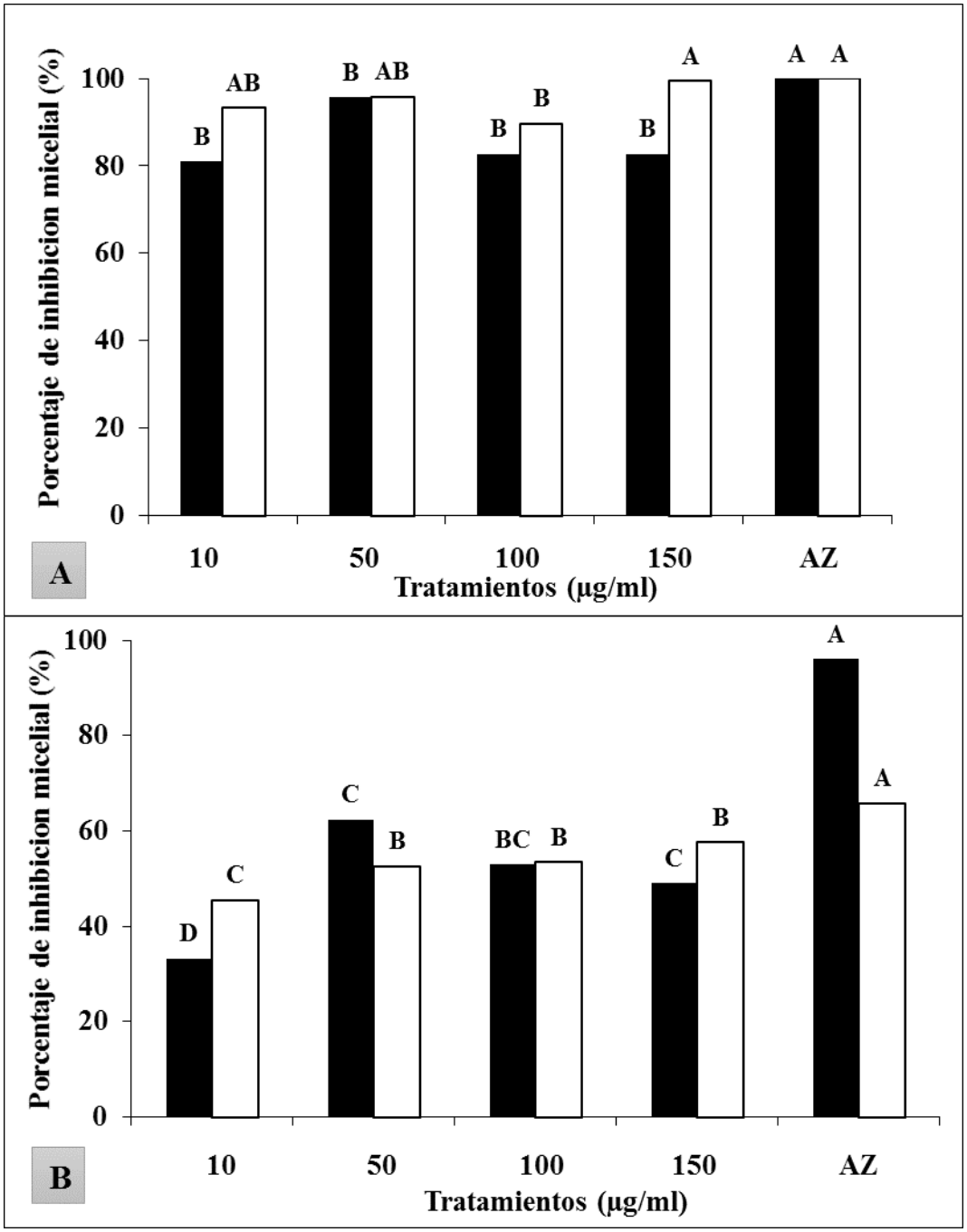


Figura 14. **Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Switch®62.5 WG los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B)**. Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren significativamente (p = 0,05).

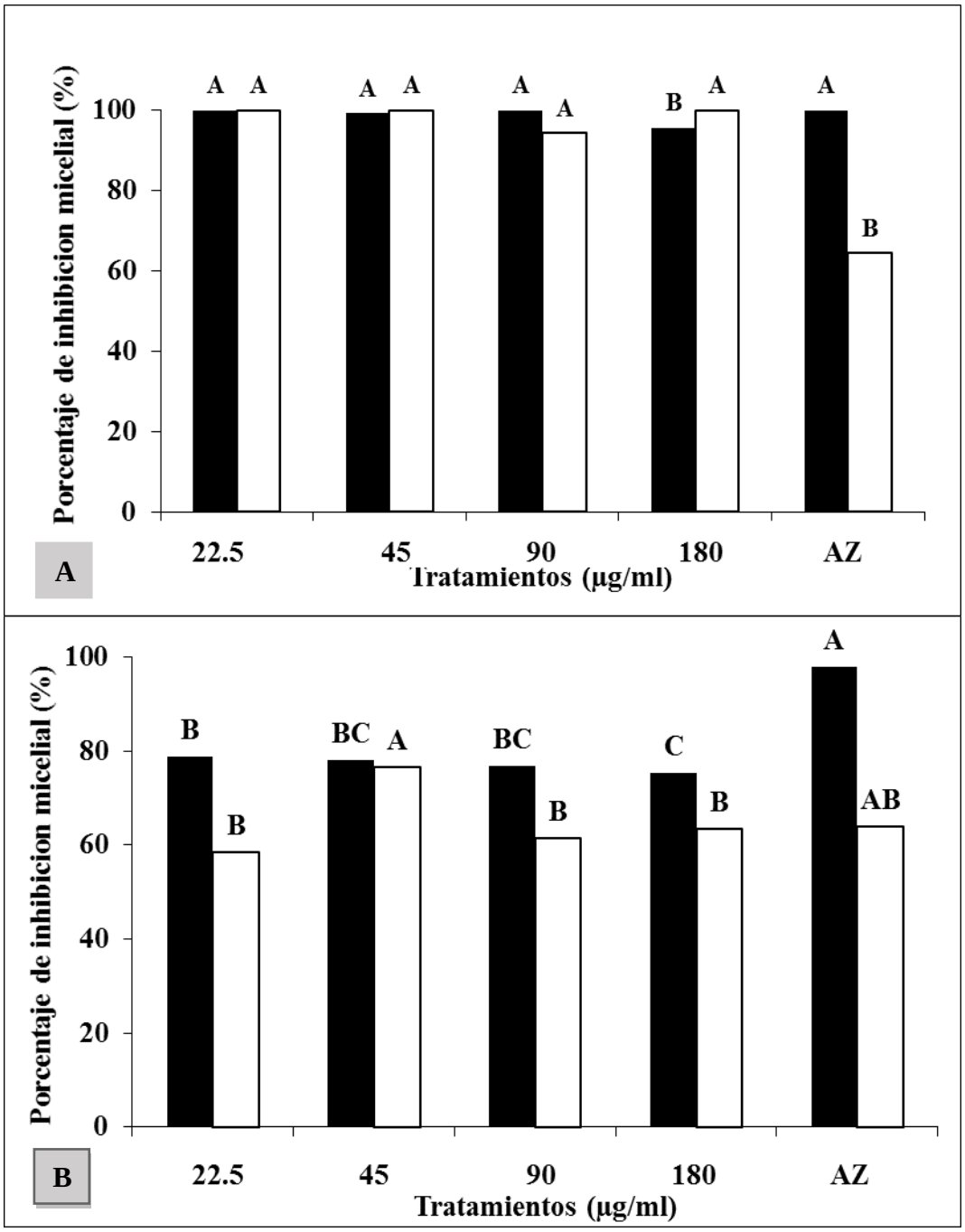


Figura 15. Efecto antifúngico *in vitro* del fungicida Chlorothalonil® los aislados de *Colletotrichum alatae* (A) y *Colletotrichum gloesporioides* (B). Barras color negro equivale al experimento uno y la blanca al experimento dos. Quadris® (AZ) fue utilizado como el control positivo en todos los experimentos a una concentración de 10 µg ia/ml. El porcentaje de inhibición micelial (mgi) en comparación con el control (agua) fue determinado utilizando la absorbancia (OD450 nm) luego de 48 horas de incubación. El mgi fue calculado utilizando la siguiente formula: mgi = (1- An/A_0) *100; donde An es la absorbancia de cada tratamiento y, A_0 es la absorbancia del control (conidios no tratadas). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren significativamente (p = 0,05).

Tabla 5. Análisis estadísticos de la severidad del área bajo la curva de la enfermedad estandarizado, último dato de severidad y los rendimientos en base a los tratamientos fúngicos (Apéndice 5).

Tratamientos[1]	$AUDPC_s$[2]	Último dato severidad	Rendimientos[2] Kg/ha[4]
Switch®62.5 WG	13.93 a	41.63 a	5365 b
Quadris®	16.10 ab	48.31 bc	3731 ab
Trilogy®	16.30 abc	45.25 ab	4646 ab
Chlorothalonil 720	16.65 abc	47.06 bc	4007 ab
Regalia® (+)[3]	17.18 abc	48.88 bc	4603 ab
Regalia®	17.55 bc	48.31 bc	3491 ab
Fontelis™	17.80 bc	48.88 bc	4356 ab
Kphite 7LP	18.08 bc	48.88 bc	4233 ab
Kocide® 3000	18.58 bc	49.44 c	766 a
Control	19.75 c	48.88 bc	3778 ab

[1] Dosis promedios establecido por las etiquetas.
[2] Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).
[3] Concentración mayor establecida por la etiqueta.
[4] Los datos fueron extrapolados basados en la siguiente formula:

$$\frac{Kg}{100\ ft^2}\ x\ \frac{43{,}560\ ft^2}{1\ ac} = Kg\ \tilde{n}ame/ac$$

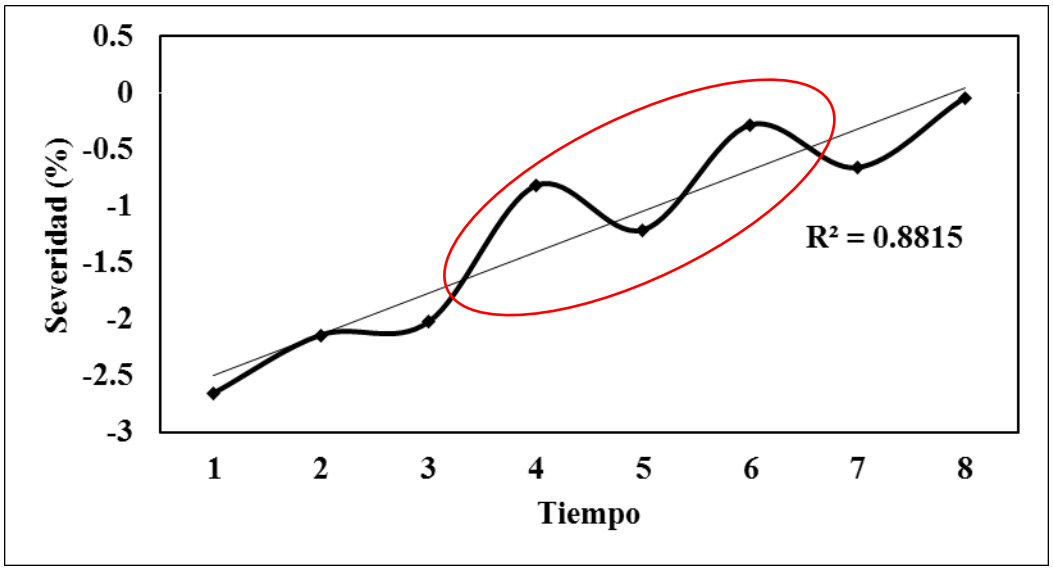


Figura 16. Porcentaje de la severidad de la enfermedad transformado a log en base al tiempo. El eje de x corresponde las fechas de los muestreos de severidad comenzando el 25 de junio del 2015 y culminando el 22 de octubre del 2015. Tiempo de toma de datos a un intervalo de 14 días.

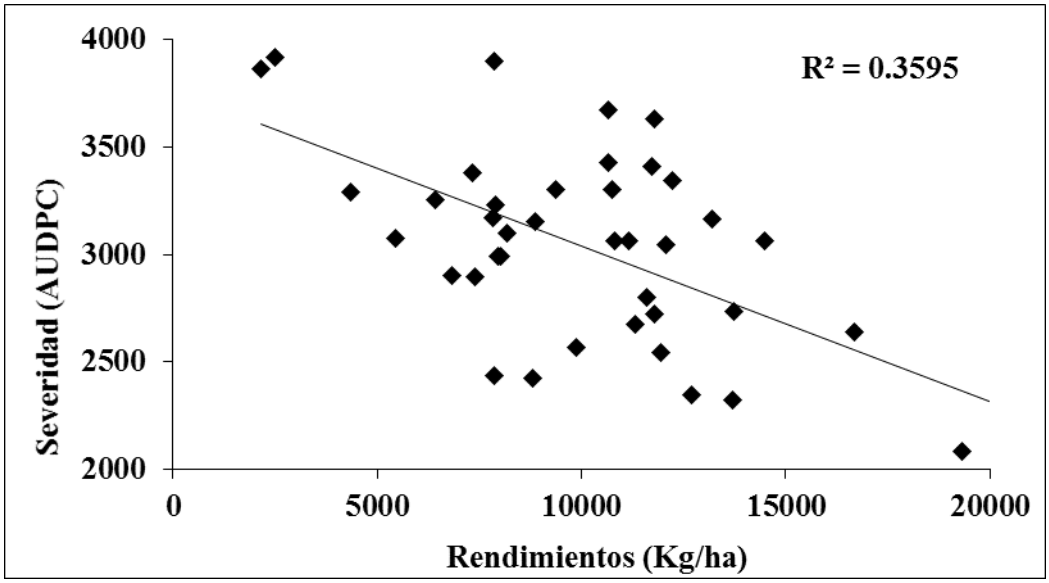


Figura 17. Correlación entre los rendimientos (kg/ha) y la severidad (AUDPC) de la enfermedad.

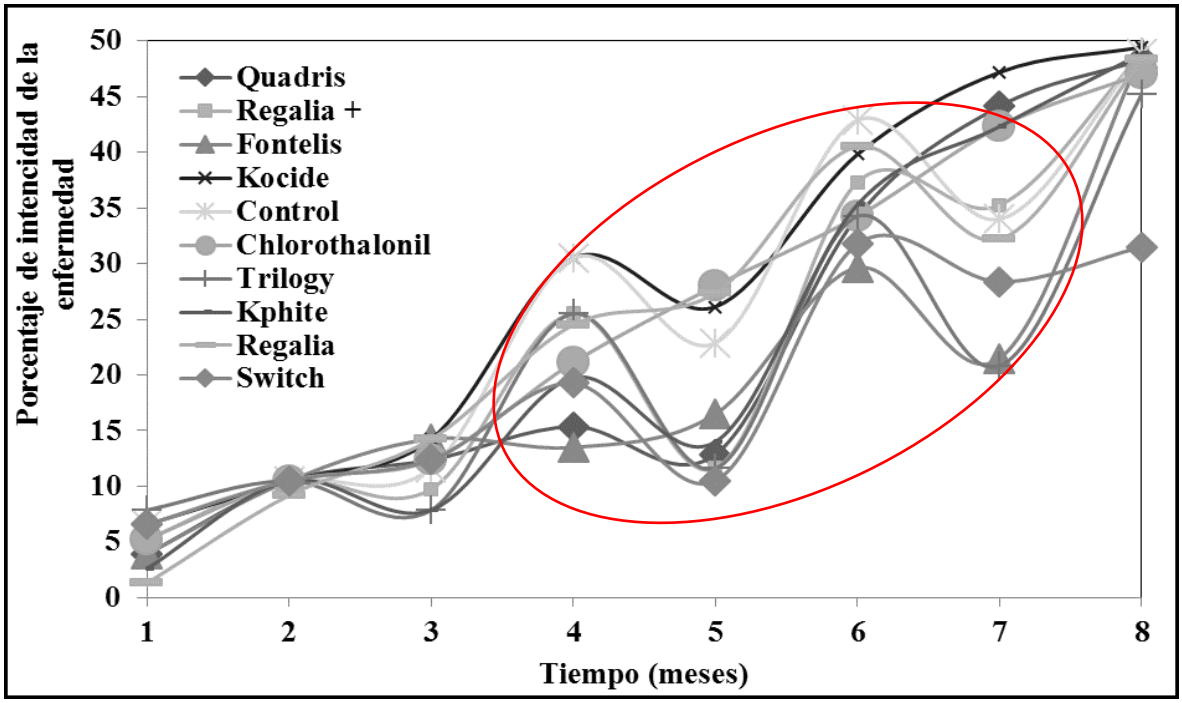


Figura 18. Desarrollo de la intensidad de la epidemia (%) durante el tiempo para todos los tratamientos fúngicos. El eje de x corresponde las fechas de los muestreos de severidad comenzando el 25 de junio del 2015 y culminando el 22 de octubre del 2015.

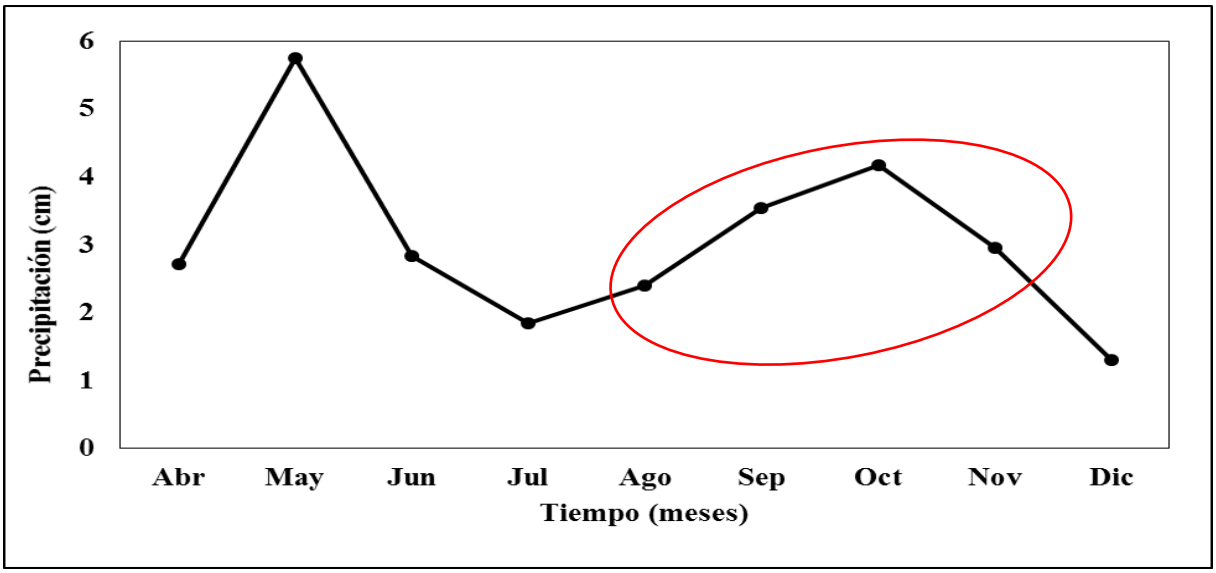


Figura 19. Precipitación (cm) promedio por cada mes de toma de datos en la Estación Experimental Agrícola en Isabela PR de la Universidad de Puerto Rico.

Tabla 6. Características de las bacterias aisladas de las muestras obtenidas de muestras foliares en el experimento *in vivo* de *Dioscorea alata* cv. Diamantes.

Aislados[1]	Descripción de la colonia[2]	Tinción Gram	KOH 3 %
DIA-B 01	Bacilos, presencia de esporas, colonias redondas de color amarillo, con margen liso, elevación convexa y margen liso.	+	-
DIA-B 02	Bacilos, colonias redondas color crema, con margen liso, elevación convexa y margen liso.	-	+
DIA-B 03	Bacilos, colonias con forma irregular, elevación plana, margen entero y color amarillo translúcido.	-	+
DIA-B 04	Bacilos, colonias redondas de color amarillo, con margen liso, elevación convexa y margen liso.	+	-
DIA-B 05	Bacilos, colonias redondas de color crema, con margen liso, elevación convexa y margen liso.	+	-

[1]Bacterias aisladas del cultivar Diamantes.
[2]Descripción en medio de agar nutritivo (NA).

DISCUSIÓN

Este proyecto fue diseñado con el objetivo de evaluar alternativas de manejo a enfermedades foliares en ñame en Puerto Rico. La antracnosis es una de las enfermedades foliares de mayor importancia económica en la isla (EEA, 1997). Por ende, la falta de fungicidas efectivos para manejar la enfermedad es una necesidad presente.

Bajo los fungicidas certificados como OMRI, nuestros resultados *in vitro* demostraron que Trilogy® no resultó ser eficiente inhibiendo el crecimiento micelial de los aislados de *Colletotrichum.* Estos resultados son sustentados por otras investigaciones donde Trilogy® no resultó ser efectivo para el manejo de enfermedades causadas por hongos del genero *Colletotrichum* y Phomopsis (Feliciano, 2011; Hagan and Akridge, 2007). En investigaciones con *Colletotrichum coccodes* Trilogy® actuó como un promotor de crecimiento en las concentraciones más bajas (Feliciano, 2011). Efectos similares fueron observados en nuestros experimentos con el aislado de *C. alatae*. Esto sugiere que este producto puede actuar a ciertas concentraciones de forma contraria a los establecido en la etiqueta. El ingrediente activo de este producto, aceite de neem obtenido del árbol *Azadirachta indica* proviene de India y ha sido utilizado por siglos como insecticida, fungicida y la medicina alternativa (Dai et al., 2001, Jarvis and Morgan, 2000; Chaturvedi et al., 2003). Productos comerciales como Achook, Bioneem, Nimbecidine and Neemark, han demostrado tener efectividad inhibiendo el crecimiento micelial de hongos tales como; *Fusarium oxysporium*, *Alternaria solani, Curvularia lunata*, *Helminthosporium* sp. y *Sclerotium rolfsii*, pero no para especies de *Colletotrichum* (Linner, 2015; Bhonde et al., 1990).

Regalia® tuvo un efecto inhibidor a la concentración de 20 µg/ml para el aislado de *C. alatae,* mientras que las otras concentraciones promovieron el crecimiento de este. Por otro lado,

para *C. gloesporioides* tuvo un efecto inhibidor en todas las concentraciones evaluadas de hasta un 53 % para la concentración de 20 μg/ml. Nuestros datos difieren de investigaciones previas con otra especie de *Colletotrichum* donde este fungicida resultó ser bien efectivo inhibiendo el crecimiento micelial del hongo en más de un 50 % en todas las concentraciones evaluadas (Feliciano, 2011). Es importante señalar que las concentraciones evaluadas en nuestra investigación fueron más bajas que las evaluadas por Feliciano (2011) y aun así se observó reducción en el crecimiento micelial de *C. gloesporioides* Es posible que las utilizaciones de dosis secuenciadas más altas presenten una respuesta mayor de inhibición del crecimiento de esta especie como observado en otras especies de *Colletotrichum* y como lo sugiere el comportamiento de la gráfica en nuestros resultados. Por lo que podemos sugerir una relación dosis-respuesta positiva.

A nivel de campo, con ninguno de los dos fungicidas, Regalia® y Trilogy® se observaron diferencias significativas en cuanto a la severidad de la enfermedad ni en los rendimientos obtenidos a los ocho meses después de la siembra. Estos datos coinciden con los obtenidos en investigaciones previas con *Colletotrichum* y *Phytophtora* utilizando estos fungicidas en el cultivo de tomate (Feliciano, 2011; Johnson et al., 2015). Debido a que ninguno de los productos esta registrado para ñame es posible que las dosis utilizadas a nivel de campo basadas en el cultivo de la papa como establecido en la etiqueta no sean las recomendadas para este cultivo. Por lo que seria necesario una evaluación de dosis para cada uno de los fungicidas.

Los mejores inhibidores de crecimiento micelial *in vitro* para ambos aislados de *Colletotrichum* fueron; Chlorothalonil®720, Switch® 62.5 WG y Fontelis®. Switch® 62.5 WG presentó una inhibición en el crecimiento micelial de hasta un 100 % para *Colletotrichum alatae*.

Mientras que para *C. gloesporioides* tuvo una inhibición de hasta un 63 %. A nivel de campo este fungicida fue el único que mostró tener efecto reduciendo la severidad en conjunto al control positivo. Switch® 62.5 WG se compone de dos ingredientes activos; Fludioxinil y Cyprodinil, con modos de acción completamente diferentes. Fludioxionil afecta la señal de traducción del DNA y posee un riesgo de bajo a mediano de desarrollo de resistencia por parte de los hongos (FRAC, 2016). Mientras que Cyprodinil afecta la síntesis de proteínas y aminoácidos, específicamente la biosíntesis de metionina y los riesgos de desarrollo de resistencia son medianos (FRAC, 2016). Experimentos previos realizados por MacKenzie y colaboradores (2009) para el control de *Colletotrichum gloesporioides* en fresas a nivel de campo demostró la efectividad de la combinación de ambos ingredientes activos inhibiendo la severidad de la enfermedad. Los autores de esta investigación sugieren la utilización de ambos ingredientes juntos ya que Fludioxionil es un fungicida de contacto y Cyprodionil es sistémico lo que aumenta las posibilidades de control al actuar como preventivo o curativo.

Aunque Switch® 62.5 WG presentó reducción en la severidad, no tuvo efecto sobre los rendimientos. Esto pudo ocurrir debido a que por efectos climatológicos (sequía) las plantas pudieron desarrollar sus tallos y hojas, hasta poder llegar a la fase de tuberización (Figura 19). Luego es que se observa un aumento sustancial en la precipitación, dando paso a la dispersión del patógeno y así creando la epidemia (Figura 14). El único fungicida que mostro ser efectivo controlando la candelilla en condiciones *in vivo* fue Switch® 62.5 WG y el control positivo (AZ) siendo significativamente diferentes con el control no tratado.

Chlorothalonil®720 demostró tener una inhibición mayor del 95 % para todas las concentraciones, y repeticiones con *C. gloesporioides*. En el caso de *C. alatae* la inhibición fue mayor de 80 % a concentraciones mayores de 45 µg/ml. Estos resultados son respaldados por

investigaciones previas en *Alternaria* el cual demuestra la efectividad de este fungicida inhibiendo el crecimiento del micelio en condiciones *in vitro* (Issiakhem and Bouznad, 2010). Por otro lado, no fue efectivo en condiciones *in vivo* reduciendo la severidad. En Puerto Rico en los años 80 Mignucci (1981) y colaboradores evaluaron dos concentraciones de este fungicida y recomiendan su uso alternado con otros fungicidas o con la utilización de cultivares resistentes. Sin embargo, este no es utilizado regularmente por los productores de ñame en la isla. El modo de acción de este fungicida es de contacto lo que significa que permanece en la superficie de la planta y no absorbido por la misma y por ende expuesto a ser lavado por la precipitación o el roció (McGrath, 2004). Nuestros resultados sugieren el posible lavado del producto de la superficie de la planta debido al aumento de la precipitación en las aplicaciones realizadas en los meses de agosto a octubre (Figura 19). Dentro de los fungicidas sintéticos que afectan la respiración mitocondrial de los hongos se encuentran Fontelis® y Quadris®. Penthiopyrad el ingrediente activo de Fontelis® el cual tiene efecto en el complejo II en la enzima succinato deshidrogenasa. Este por su parte resultó ser efectivo inhibiendo el crecimiento micelial > 50 % para ambas repeticiones en el aislado *C. alatae*. Mientras que para *C. gloesporioides* tuvo un efecto inhibidor > 40 % para las concentraciones 50, 100 y 200 µg/ml. Con concentraciones menores de 12.5 µg/ml promovió el crecimiento micelial. Este producto ha sido comparado con las estrobilurinas por su eficacia en inhibir la germinación de esporas del hongo en enfermedades en tomate (Yanase et al., 2013). Sin embargo, debemos tener precaución en el uso de este producto ya que según el código FRAC posee de mediano a alto riesgo de que los hongos desarrollen resistencia por su modo de acción.

Por otro lado, existen productos que poseen actividades antifúngicas que se desconoce su modo de acción como lo es el caso de Kphite® 7LP. Este es un fungicida sistémico utilizado para

el control de añublos, *Phytophtora* y *Phytium* (Plant Food System) a base de ácido fosfórico. Este no tuvo un efecto inhibidor en el crecimiento micelial para *C. gloesporioides*, al igual que para el aislado *C. alatae*, con la excepción de la concentración 100 μg/ml que tuvo un 30 % de inhibición. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos realizados en el 2008 para evaluar la inhibición de *Armillaria* en melocotón donde el ácido fosfórico no fue lo suficientemente efectivo controlando esta enfermedad (Amiri et al., 2008).

También se encuentran fungicidas de contacto con efecto multi-sitio considerado fungicidas inorgánicos como es el caso de Kocide® 3000, a base de cobre. Este producto tuvo una inhibición micelial que incrementó a medida que la concentración del producto aumentó. Es decir que a mayor concentración de ingrediente activo mejor es su efecto control. Esto se puede observar en investigación previa en *Colletotrichum* para dos formulaciones diferentes (46.1 % y 53.8 % i.a) en el 2011 (Feliciano, 2011). A concentraciones menores de 2 μg/ml se observa que promovió el crecimiento micelial. Se ha encontrado poco o ningún caso de desarrollo de resistencia de organismos a este producto (FRAC, 2016). Por ser este un fungicida de contacto, es posible que el mismo efecto sugerido para Chlorothalonil con respecto a la precipitación haya mediado en el efecto de la respuesta obtenida por este producto.

Debido a condiciones climatológicas poco comunes en el área de Isabela, se puede sugerir que estas condiciones afectaron la efectividad de los productos, particularmente los de contacto. Cuando observamos el grafico del progreso de la severidad de la enfermedad (Figura 16) y la precipitación observamos que el aumento en la severidad de la enfermedad ocurrió al mismo tiempo que se observó un incremento en la precipitación en los meses de agosto a octubre (Figura 19). A principios de la siembra se observan períodos de lluvias intensas lo que ayudo a la brotación de los ñames (primera fase). Ya cuando el proceso de tuberización (fase dos) comenzó,

se observó un período de sequía, la cual retrasó el desarrollo de la enfermedad en el campo. Para el proceso de maduración del tubérculo (fase tres) sé que observó un aumento exponencial de la intensidad de la enfermedad para los meses de octubre a noviembre (Figura 18). Ya en este punto y como demuestra los resultados, solo el fungicida Switch®62.5 WG tuvo la eficacia de controlar la epidemia, pero no así habiendo diferencias en rendimientos debido a que ya el proceso de tuberización había comenzado y el periodo de maduración estaba en progreso. Esto ocasionó que no hubiese diferencia significativa en cuanto a los rendimientos, aun con una reducción en la severidad por parte de Switch®62.5 WG, por esto no se observa una correlación alguna (Figura 17). Investigaciones en otros cultivos han demostrado que si enfermedades foliares afectan las plantas luego de que comienza el proceso de fructificación los rendimientos no se ven afectado. Es posible que los resultados obtenidos en nuestro estudio sean una combinación del efecto de la lluvia y el momento de aumento en la severidad de la enfermedad.

El control positivo utilizando en los experimentos a nivel *in vitro* como *in vivo* es catalogado por el código FRAC como de alto riesgo ("high risk") de desarrollo de resistencia por parte de organismos patogénicos. Al presente este es el único de todos los fungicidas evaluados que posee registro para la utilización en ñame en Puerto Rico. Esto es una alerta para los agricultores ya que se ha documentado el desarrollo de resistencia a AZ en especies de *Colletotrichum* (Young et al., 2010; Wong et al., 2007; Avila-Adame et al., 2003). Brindarle al agricultor alternativas que puedan ser implementadas en un manejo integrado en sus fincas, podrían disminuir la intensidad de la enfermedad. Para un mejor manejo de los recursos se debe orientar a los agricultores a cómo utilizar de manera correcta cada producto, para así evitar problemas de mayor importancia como lo es el desarrollo de resistencia de organismos patógenos.

CONCLUSIÓN

- Switch® 62.5 WG resultó ser el fungicida con mayor eficacia en el manejo de la enfermedad causada por *Colletotrichum in vitro* en *in vivo*.
- Los fungicidas Switch® 62.5 WG y Chlorothalonil®720 fueron efectivos inhibiendo el crecimiento micelial de ambos aislados de *Colletotrichum* en los ensayos colorimétricos *in vitro.*
- Todos los tratamientos mostraron una alta incidencia de antracnosis, indicando que la variedad Diamantes no es resistente a esta enfermedad.
- En general los rendimientos obtenidos en todos los tratamientos son más bajos de lo esperado, mostrando como los rendimientos pueden ser altamente afectados por un ataque severo de enfermedades foliares.
- Es recomendable evaluar estos fungicidas alternados en futuras investigaciones para evaluar su eficacia.

CAPÍTULO 3

ETIOLOGÍA DE LA MUERTE REGRESIVA DEL TALLO DEL ÑAME FLORIDO (*DIOSCOREA ALATA* CV. FLORIDO) EN CONDICIONES DE ALMACENAJE

INTRODUCCIÓN

El ñame Florido (*Dioscorea alata*) es un cultivar endémico de Puerto Rico, preferido por los puertorriqueños, pero de gran susceptibilidad a la antracnosis (Mignucci, 1988). Debido a esto, los agricultores se movieron a la producción del ñame Habanero (*D. rotundata*), o a la importación del cultivar Diamantes (*D.* alata) de Costa Rica (González, 2006). El cultivar Diamantes se seleccionó y liberó para uso comercial por ser tolerante a la antracnosis y por sus altos rendimientos (Aguilar y Jiménez, 1992).

El ñame es afectado por diferentes plagas y enfermedades. Los síntomas característicos de la antracnosis son pequeños puntos de color pardo rojizo con un halo amarillo, las lesiones crecen rápidamente sobre la lámina foliar causando necrosis y finalmente la caída de las hojas ocasionando mayor daño al *D. alata* (Osorio y Ramírez, 1989). A la especie *D. rotundata* se le asocia la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum.* Esta se caracteriza por marchitez de las hojas y muerte de los tallos desde el ápice hasta la base de las plantas, coloniza intra e intercelularmente el tejido de las plantas enfermas, que muestran una coloración rojiza en su interior, se identifica como una muerte regresiva (dieback) (González et al., 1997; Pinzón et al., 2013; Fuentes, 2015). Mignucci y colaboradores en el 1988, identifica las tres cultivares de ñame de mayor demanda en la isla como resistentes o susceptibles a diferentes enfermedades (Tabla 7).

Se estudió la etiología de la muerte regresiva del tallo del ñame Florido. Debido a síntomas no característicos asociados a esta cultivar en condiciones de almacenaje. Se

caracterizó morfológica, patogénica y molecularmente aislados encontrados en el tejido sintomático.

Tabla 7. Resistencia de cultivares de ñame a diferentes enfermedades (Mignucci, 1988).

	Pudrición tubérculo				
Cultivares	Almacenaje	Campo	Pudrición de raíz	Cancro tallo	Marchitez vascular
Guinea blanco	HS	MS	HS	S	S
Guinea negro	HS	MS	MS	MS	NI
Florido	R	R	S	R	R

Clave: R= resistente; S= susceptible; MS= moderadamente susceptible; HS= altamente susceptible; NI= No información

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras y síntomas

Durante el mes de enero del 2015 se identificaron síntomas no particulares de esta especie en condiciones de almacenaje, ubicado en los almacenes de la Estación Experimental Agrícola en Isabela (Figura 20). Los tallos presentaban una necrosis desde el ápice hasta la base, teniendo como resultado la muerte del brote (o tallos iniciales). Se colectaron 12 tubérculos sintomáticos para ser posteriormente procesados en el Laboratorio de Epidemiología y Fitopatología de la Estación Experimental Agrícola de Isabela.

Cámaras húmedas

Para realizar las cámaras húmedas se seleccionaron tres tubérculos sintomáticos y se les removió el suelo con agua y jabón. Una vez limpios los tubérculos, se colocaron en un envase que contenía papel humectante humedecido y se incubaron durante cinco días a temperatura

ambiente (24°C) para promover la producción de signos del o los posibles agentes causales de la muerte regresiva del tallo de *D. alata* cv. Florido (Agrios, 2005).

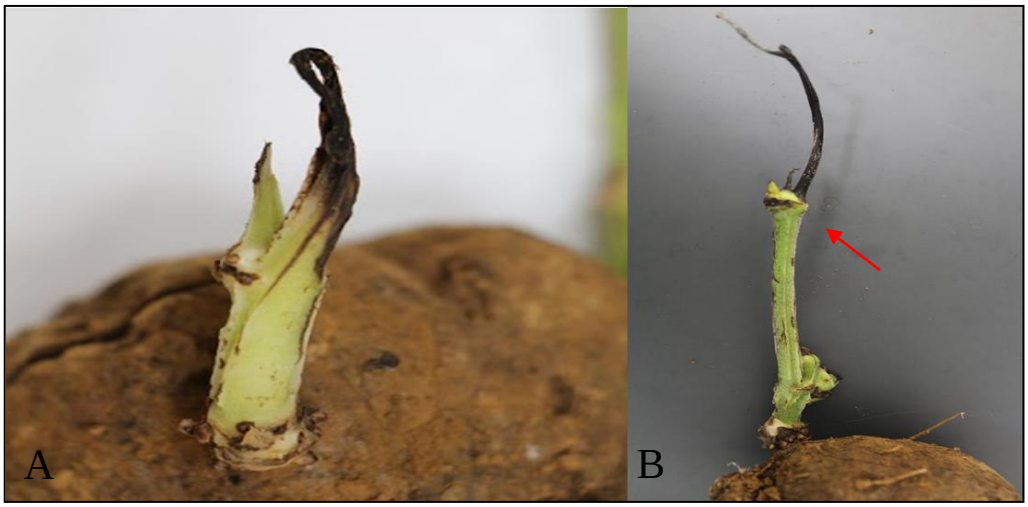


Figura 20. Síntomas observados en el tallo del ñame *Dioscorea alata* cv. Florido en los almacenes de la Estación Experimental Agrícola de Isabela. (A y B) Muerte regresiva del ápice a la base del tallo y necrosis en el ápice de los brotes

Aislamiento e identificación de hongos

Se realizaron aislamientos del tallo de 12 tubérculos colectados y de los colocados en las cámaras húmedas. El aislamiento de tejido se realizó siguiendo la metodología de Agrios, 2005 en medio artificial de Agar de Papa y Dextros (PDA, 39g/1L) para el crecimiento de los hongos. Las placas Petri de PDA con los cortes de tejido fueron incubados a 27°C por siete días. Luego se purificaron los aislados y se procedió a la preparación de cultivos monospóricos con los aislados que presentaron producción de conidios en PDA (Goh, 2009; Choi et al., 2009). Una vez purificados los aislados se prepararon laminillas semipermanentes para su identificación

morfológica y se describieron las colonias (tipo de crecimiento, coloración, presencia de micro esclerocios, masas de conidios y su color) en PDA.

Se determinó el tamaño de 25 conidios colectados al azar utilizando el programa *PAX*-it™ Imaging Software a una magnificación de 40X en el microscopio de luz (Olympus, BH2) de los aislados que los produjeron en medio artificial de PDA. Para los aislados identificados morfológicamente bajo el género *Colletotrichum* se utilizó el medio selectivo de habichuelas tiernas (GBA, lata de Green beans/L mezclado con 20g de agar) para inducción de producción de conidios (Biles, 1990) Este género de hongos se caracteriza por producir apresorios durante el proceso de infección (Agrios, 2005). Esta estructura en conjunto con los conidios es utilizada para la clasificación taxonómica de especies de *Colletotrichum* (Weir et al., 2012, Baquero, 2002). Para inducir la formación de apresorios se colocó un disco de micelio (3 mm) sobre una laminilla con el micelio hacia arriba y se colocó un cubreobjetos de plástico sobre el micelio (Chaky et al., 2001). La laminilla se colocó dentro de una placa Petri con papel humectante húmedo, se dejó incubando de tres a cinco días bajo luz constante a 28°C. Para observar las estructuras se colocó el cubre objeto sobre una nueva laminilla con lactofenol y se seleccionaron 25 apresorios al azar para determinar su tamaño (Baquero, 2002; Rojas et al., 2010).

Para determinar la tasa de crecimiento de cada aislado se realizaron curvas de crecimiento (Crouch et al., 2009; Rojas et al.2010). Las curvas de crecimiento se realizaron en medio artificial PDA. Se colocó un sacabocado de 3 mm en el centro de la placa de cada uno de los hongos aislado y se incubo a 28°C por 7 días (Figura 22). Se tomó la medida del diámetro de la colonia cada dos días hasta que el primer hongo cubrió la superficie del plato Petri con el crecimiento micelial (8 cm).

Pruebas de Patogenicidad

Con los hongos aislados se realizaron pruebas de patogenicidad siguiendo los postulados de Koch (Agrios, 2005). Tubérculos con tallos sanos fueron seleccionados para la realización de las pruebas de patogenicidad. Se removió el suelo con agua y jabón, luego se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % por 10 minutos y se dejaron secar (Figura 21 - A). Se prepararon cámaras húmedas (91 cm x 61 cm) y se colocaron 3 tubérculos por cada envase (Figura 21 - B). Se realizaron incisiones a cada tallo y se colocó un sacabocado de 1 mm del micelio del hongo en cada incisión (Figura 3). Se incubaron las cámaras húmedas a temperatura ambiente durante siete días. Las pruebas de patogenicidad se repitieron dos veces en experimentos independientes.

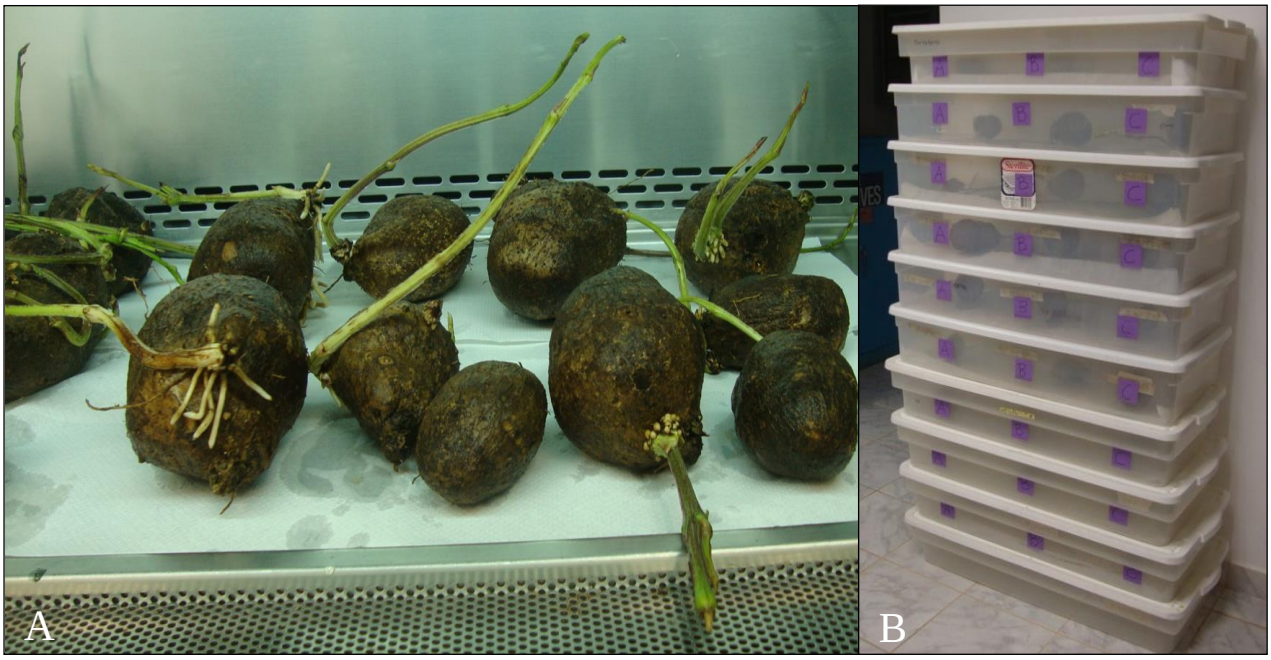


Figura 21. Preparación de las pruebas de patogenicidad. (A) Tubérculos sanos y estériles para la preparación de las pruebas de patogenicidad y (B) cámaras húmedas utilizadas en las pruebas de patogenicidad.

.

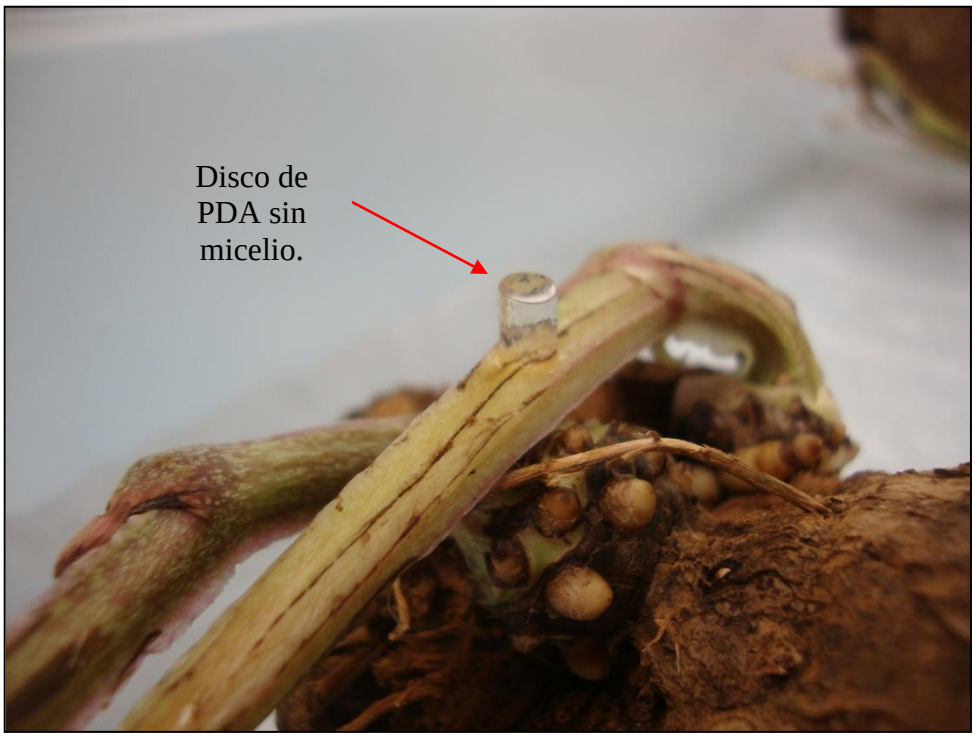


Figura 22. Preparación de pruebas de patogenicidad para los hongos aislados de la muerte regresiva del tallo.

Caracterización molecular

Todos los aislados fueron cultivados en caldo de papa y dextrosa (PDB; Difco Laboratories) en matraces de 125 ml por 7 días a 28° C para realizar la extracción de ADN. Se filtró el medio y el micelio por un embudo Bunchner y papel de filtro estéril para remover el exceso de líquido (Rojas et al., 2010). Se extrajo el ADN, utilizando el kit de extracción comercial de Qiagen DNeasy Mini Kit (Qiagen®, CA; Cat. No. 69104) siguiendo las instrucciones del manufacturero con algunas modificaciones. Para la maceración del tejido se utilizó el Disruptor Genie® (Cell Disruptor; LabRepCo; Cat. No. SI-DD38) y los parámetros utilizados fueron un ciclo de 4 minutos a 3,000 rpm y un ciclo de 2 minutos a esta misma velocidad. Además, se modificó el tiempo de incubación en el baño de María luego de añadirle la RNAase y el amortiguador AP1 por una hora en vez de 10 minutos (Apéndice 6). Las concentraciones del ADN se midieron con el fluorómetro Qubit® 3.0 (Qubit® 3.0 Fluometer; ThermoFisher; Cat. No. Q33216) y el ADN fue conservado a -20˚C hasta ser utilización.

Para la amplificación de PCR se utilizaron las regiones de ITS del ADN ribosomal, utilizando cebadores específicos para los genes de ITS (615 pb), genes de Beta tubulina (β-Tubulin; 716 pb), cebadores del factor de elongación (Elongation factor [EF]; 800 pb) y GAPDH (308 pb) anteriormente utilizados para la caracterización molecular de especies de *Colletotrichum* (Weir et al., 2012). La reacción para llevar a cabo el PCR fue de 10 µL de Amplitaq Gold® (ADN Polimerasa; Applied Biosystems Cat. No. 4390939), 1.5 µL de cada cebador (“foward” y “reverse”), 5 µL de agua ultra pura HPLC (Alpha Aesar, Cat. No. 7732-18-5) y 2 µL de ADN con una concentración de 20 a 25 ng/µl, para un volumen total de 20 µL por reacción. Las muestras fueron amplificadas en un termociclador (Eppendorf AG, 22331, NJ) con las siguientes condiciones: desnaturalización de 10 min a 95°C, 35 ciclos de 96°C por 3 seg, la

temperatura de alineamiento del marcador molecular correspondiente a 3 seg, la hibridación a 68°C a 15 seg y una extensión final de 72°C a 10 seg. Las temperaturas para los alineamientos de los cebadores específicos fueron las siguientes; ITS a 52˚C, β-tubulina a 55˚C, EF a 60˚C y GAPDH a 58˚C. Los parámetros del PCR se establecieron según las recomendaciones del manufacturero para la enzima AmplitaqGold®.

El producto de PCR se observó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % (Agarosa, OmniPur™; Merk Millipore) con amortiguador de 1X Tris-acetate-EDTA y 2.5 µL de Gel Red (Gel Red™ Nucleic Acid, BIOTIUM). Se utilizó 2 µL del tinte (GelPilot Loading Gye 5x, Cat. No. 239901) para que el ADN produzca fluorescencia y pueda ser observado a simple vista. El gel tuvo una corrida a 110 voltios y 400mAmps por 60 min. El gel fue observado en un iluminador de rayos ultravioleta (SIGMA™, T 1202). Se utilizó el kit QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Cat. No. 28706) para la purificación de las muestras, siguiendo las instrucciones de manufacturero (Apéndice 6).

La secuenciación de los productos de PCR ya purificados con una concentración de 20 ng se realizó en las facilidades comerciales de Macrogen, Inc. (Macrogen, MD). Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor, Carlsbad, CA 92008) y analizadas observando los porcientos de calidad de cada secuencia con el programa Sequencer® 5.3 (MI, USA). Estas fueron analizadas en BLAST del Centro Nacional para Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information; NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov) para examinar su similitud con otras secuencias utilizadas como referencia.

Los arboles filogenéticos basado en el parámetro de Kimura 2 (K2) (Kimura, 1980) se basó en un árbol consenso con 1000 réplicas (Felsentein, 1985), con las secuencias obtenidas en

este estudio (Apéndice 7) y las secuencias de referencia (Apéndice 8), estos se analizaron mediante el programa MEGA 7.0 (Kumar et al., 2015) para realizar un alineamiento múltiple con el programa ClustalX. Como "Outgroup" se utilizó *Colletotrichum pisi* para los tres genes estudiados, ya que éste pertenece a un complejo fuera de *C. gloeosporioides*. En la construcción de los arboles filogenéticos se utilizó el método estadístico de Maximum Likelihood con los parámetros establecidos en el "software".

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un diseño completo al azar (DCA) para comparar la curva de crecimiento de los aislados, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y fueron comparados por un análisis de diferencias mínimas significativa (LSD) con el programa de análisis estadístico InfoStat® Versión 2016 (InfoStat, FCA, Córdova Argentina).

RESULTADOS

Recolección de muestras sintomáticas y aislados obtenidos

De los doce tubérculos con brotes de tallos muestreados se aislaron ocho hongos asociados a la muerte regresiva del tallo del ñame Florido. El síntoma principal observado fue descrito como una necrosis desde el ápice del tallo hasta la base del brote cerca de la corteza del tubérculo (Figura 1).

En los tubérculos colocados en las cámaras húmedas, se observó esporulación típica de *Colletotrichum* sobre la necrosis del tallo y en los cortes de tejido realizados se identificaron estructuras de hongos tales como acérvulos, peritecios y conidios de diferentes formas y tamaño (Figura 23).

Aislamiento e identificación de hongos

La mayoría de los hongos fueron identificados a nivel de género, utilizando las estructuras de reproducción (Tabla 9, Figura 25). Se identificaron morfológicamente dos aislados del género *Fusarium* spp., dos aislados de la familia de las Botryosphaeriaceae, uno del género *Colletotrichum* sp. y un aislado desconocido el cual no produjo estructuras de reproducción en medio artificial de PDA. El tipo de crecimiento micelial y la producción de conidios para los aislados, corresponden con las características antes descritas para estos géneros (Tabla 8) (Weir et al., 2012; Lazarotto et al., 2014).

En las curvas de crecimiento se observó una diferencia mínima significativa en cuanto al crecimiento de los hongos, siendo el hongo Desconocido el que presentó la mayor tasa de crecimiento a las 48 horas. A las 96 horas de incubación un aislado identificado como miembro de la familia de las *Botryosphaeriaceae* (6) y un aislado de *Fusarium* (1) presentaron la menor tasa de crecimiento (Tabla 10).

Figura 23. Cortes de tejido realizado a los tallos del ñame Florido en las cámaras húmedas. (A y B) Conidios característicos del género *Fusarium.* 40x de magnificación.

Tabla 8. Medidas (µm) de las estructuras de reproducción de los aislados asociados a la muerte regresiva (Apéndice).

Estructuras	*Colletotrichum* (H7)		*Fusarium*(H1)		*Fusarium* (H3)	
	Largo[1](µm)	Ancho(µm)	Largo(µm)	Ancho(µm)	Largo(µm)	Ancho(µm)
Conidios	13.3	4.8	--	--	--	--
Apresorios	9.1	5.2	--	--	--	--
Macro conidios	--[2]	--	25.3	4.0	22.1	4.3
Micro conidios	--	--	3.9	2.2	4.0	2.0

[1]Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).
[2]Organismo no posee o no produjo la estructura evaluada.

Pruebas de Patogenicidad

De los hongos aislados del síntoma inicial de la muerte regresiva del tallo del ñame Florido, seis resultaron ser patogénicos en las pruebas de patogenicidad en ambas repeticiones. Los aislados evaluados presentaron síntomas similares a los observados inicialmente. El aislado identificado morfológicamente como *Colletotrichum* fue el que mayor daño provocó al tejido en menos tiempo (tres días) que los demás aislados en las pruebas de patogenicidad (Figura 24).

Caracterización molecular

Se realizó la identificación molecular de los seis aislados patogénicos de la muerte regresiva del tallo utilizando tres marcadores moleculares. De los cuales, solo las secuencias de los aislados 1, 2, 3 y 7 fueron analizadas. Debido a la baja calidad de las otras secuencias estas no fueron utilizadas para el análisis molecular y su identificación se basó en la caracterización morfológica. Las secuencias de los aislados fueron comparadas con las secuencias depositadas

en el Gen Bank, a través de BLAST. El aislado de *Colletotrichum* (H7) identificado morfológicamente resultó ser *C. queenslandicum* utilizando los genes de ITS y β-tubulina (Figura 26). El aislado de *Fusarium* H1 y el desconocido fueron identificados como *F. oxysporum* utilizando los genes de ITS y β-tubulina (Figura 27). Utilizando los mismos genes, el aislado de *Fusarium* H3 solo se pudo confirmar el género y no la especie debido a la alta similitud que guarda con otras especies de *Fusarium* (Figura 27). Los resultados de secuenciación obtenidos para los cebadores de GAPDH y Factores de Elongación no fueron considerados en los análisis filogenéticos debido a la baja calidad de las secuencias (Apéndice 7).

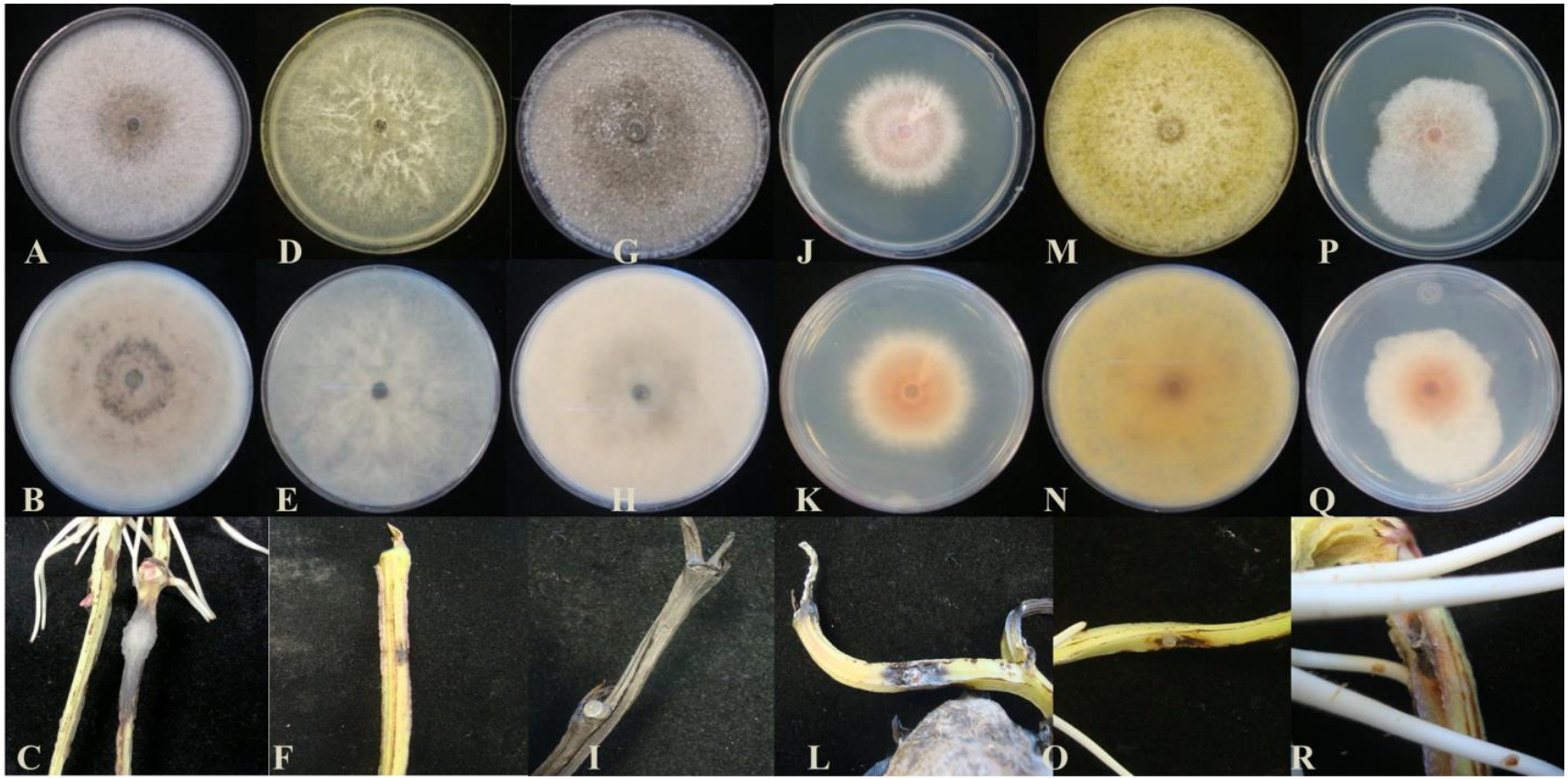


Figura 24. Hongos patógenos asociados a la muerte regresiva del tallo. (A, B, C) Los géneros; *Colletotrichum* sp., (D, E, F, G, H, I) *Botryosphaeriaceae*., (J, K, L, P, Q, R) *Fusarium* spp., (M, N, O) un desconocido.

Tabla 9. Descripción fenotípica de los aislados en medio de cultivo PDA luego de 7 días de incubación a 28˚C.

Aislados	Colonias en PDA
Colletotrichum	Micelio blanco aéreo con esporulación de masas de conidios color salmón formando anillos concéntricos y producción de microesclerocios.
Botryosphareaceae	Poca producción de micelio color crema, algodonoso, con ausencia de estructuras de reproducción.
Botryosphareaceae	Mucha producción de micelio, color negro con ausencia de estructuras de reproducción.
Fusarium	Abundante producción de micelio, aéreo, color gris en los márgenes y violeta en el centro.
Desconocido	Micelio abundante color amarillo.
Fusarium	Poca producción de micelio color blanco en los márgenes y rosa en el centro.

Tabla 10. Tasa de crecimiento micelial de los 6 hongos patógenos.

Hongos	Media 48hr (cm)	Media 96hr (cm)
Botryosphaeriaceae (H6)	1.07 a[1]	5.50 c
Fusarium spp. (H3)	1.30 ab	2.93 a
Colletotrichum sp. (H7)	1.43 ab	4.03 b
Fusarium spp. (H1)	1.67 ab	5.10 c
Botryosphaeriaceae (H4)	1.90 b	7.73 d
Desconocido (H2)	5.93 c	7.97 d

[1]Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P > 0.05)

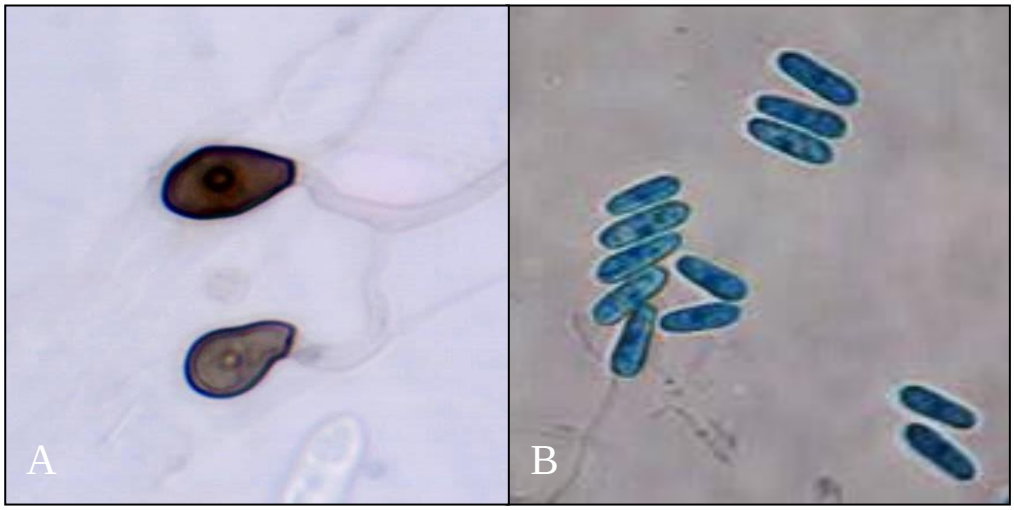


Figura 25. Estructuras de reproducción asociados al género *Colletotrichum*. (A) Apresorio ovalado con márgenes enteros y (B) conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. 100x magnificación.

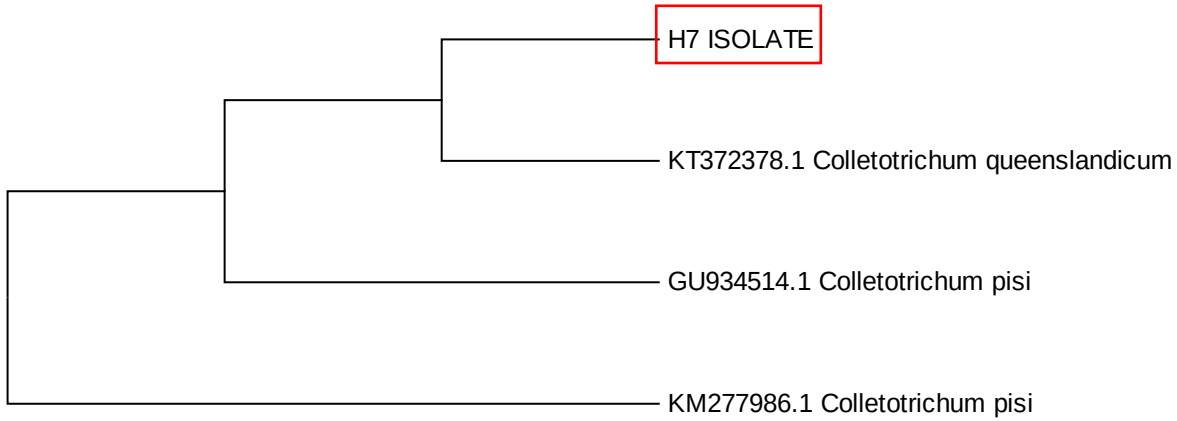


Figura 26. Árbol filogenético concatenado con los genes de ITS y β-tubulina analizado por el método Maximum Likelihood para el género de *Colletotrichum*. *C. pisi* fue utilizado como outgroup debido a la separación del complejo de *Colletotrichum gloesporioides.*

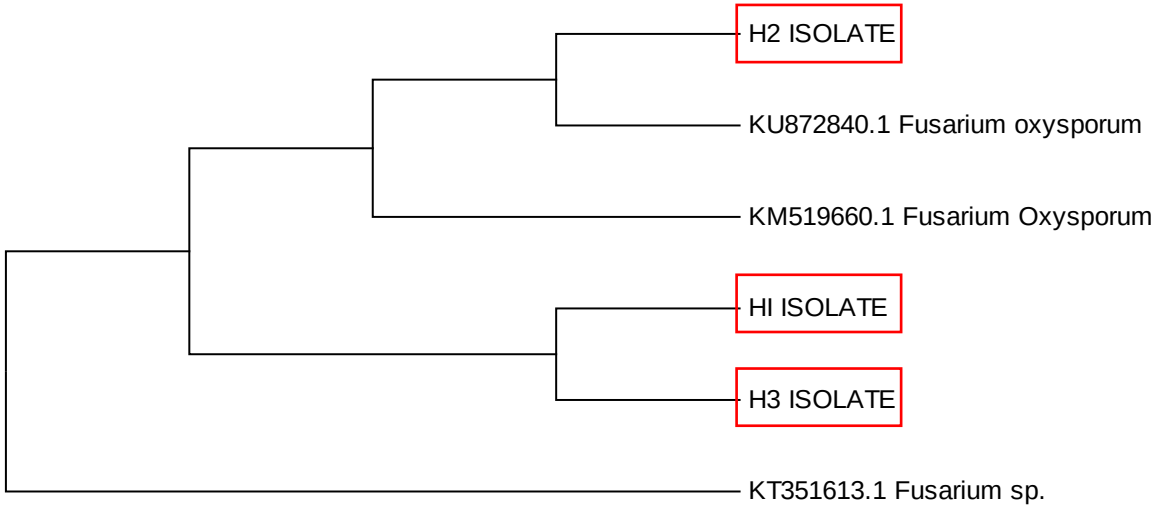


Figura 27. Árbol filogenético concatenado con los genes de ITS y β-tubulina analizado por el método Maximum Likelihood para el género de *Fusarium*.

DISCUSIÓN

La enfermedad foliar de mayor impacto en términos de severidad en el cultivar de ñame Florido (*D. alata*) en Puerto Rico es la antracnosis o comúnmente conocida como la candelilla (EEA, 1997). Debido a la limitada investigación relacionada a este cultivo existe muy pocas fuentes de referencia sobre enfermedades relacionadas a post-cosecha o en condiciones de almacenaje para este cultivar (González, 2006; Mignucci et al., 1998). En Puerto Rico en el 2015 se desarrolló un catastro para conocer cuáles son los agentes causales de la candelilla y se identificaron nueve especies patogénicas de *Colletotrichum* asociadas al follaje de este cultivo (Fuentes, 2015). Al mismo tiempo se observaron síntomas de la muerte regresiva del tallo en los brotes que anteriormente no habían sido observados en condiciones de almacenaje. Muestras de este tejido enfermo se analizaron y se encontraron ocho hongos asociados a la muerte regresiva del tallo del ñame Florido de los cuales seis resultaron ser patogénicos. Estos hongos fueron identificados como *C. queenslandicum* (H7), *Fusarium oxysporum* (dos aislados, HI y H2), *Fusarium* sp. (H3) y dos aislados de la familia Botryospheraceae (H4 y H6). En investigaciones previas con *Dioscorea rotundata* cv. Guinea blanco en Puerto Rico en el 1988 se reportó a *Fusarium oxysporum* como el agente causal de la marchitez vascular y el cancro del tallo (Mignucci et al., 1988). En el mismo estudio se reportó a *Botryodiplodia theobromae* causando el tizón el tallo. Es importante señalar que ninguno de los aislados identificados como patogénicos en nuestros resultados ha sido previamente reportado en este cultivar en Puerto Rico. Si se ha reportado a *Colletotrichum gloesporioides*, *C. alatae, C. aotearoa*, *C. cliviae*, *C. fructicola, C. ignotum, C. siamense, C. tropicale, C. theobromicola,* y *C. truncatum* asociado al follaje del cv. Florido causando la antracnosis (Fuentes, 2015; Mignucci et al., 1988; Mignucci et al., 1981). En Nigeria Akem (1999) reportó a *Fusarium* sp. causando enfermedades foliares en

D. alata en 1.7 % de la población de plantas evaluadas. Nuestros datos sugieren el posible movimiento de estos patógenos de la especie *D. rotundata* reportado previamente en la Isla a *D. alata*. Es importante señalar que debido a las perdidas en rendimientos ocasionadas por la candelilla o antracnosis en *D. alata* cv. Florido los agricultores comienzan a aumentar las siembras de *D. rotundata* como una especie más resistente a esta enfermedad a partir de los años 90. Sin embargo, esta especie es altamente susceptible a pudriciones del tubérculo en almacenaje, susceptible al cancro del tallo y la marchitez vascular causados entre otros por los hongos encontrados asociados a la muerte regresiva del tallo en este estudio. Es posible que con el incremento en la producción de *D. rotundata* también la presión de inóculo de estos patógenos haya aumentado y afecte especies que anteriormente fueron descritas resistentes a la marchitez vascular y enfermedades del tallo como es el caso de *D. alata* cv. Florido.

De todos los hongos identificados como patogénicos, *Colletotrichum queenslandicum* resultó ser el más virulento, causando necrosis severa a partir de los tres días luego de la incubación. Las especies de *Colletotrichum* previamente reportadas en este cultivar son diferentes a la identificada en este estudio y a nivel mundial no existe ningún reporte asociando esta especie con el cultivo ñame (Fuentes, 2015; Weir et al., 2012). Es posible que este hongo sea el patógeno inicial y los otros hongos identificados sean secundarios, sin embargo, se requieren evaluaciones futuras de interacción para confirmar esto.

Los aislados descritos bajo la familia de las Botryosphareaceae no fueron identificados molecularmente debido a la baja calidad de las secuencias (Apéndice 7). Debido a esto no se pudo confirmar si este es *Botryodiplodia theobromae* reportado anteriormente causando el tizón del tallo en *Dioscorea rotundata* con síntomas similares a los observados en nuestra investigación.

La identificación correcta de los patógenos es de gran importancia para poder realizar un manejo integrado de enfermedades preciso y confiable para tener una siembra libre de patógenos incluye la utilización de material vegetativo (semilla) limpio y libre de patógenos. Teniendo la posibilidad de que la semilla sea la fuente de contaminación se deben de realizar métodos para tratar las semillas en el almacén, y/o antes de sembrar para minimizar la presencia de inoculo viable al momento de la siembra, siendo este patosistema una pieza clave en la producción y preservación para este cultivar endémico de Puerto Rico. Mignucci y colaboradores en el 1988 redactaron cinco recomendaciones para evitar esta enfermedad, los cuales constan de; seleccionar una semilla de excelente calidad, sembrar en suelo con buen drenaje, utilizar herbicidas pre-emergentes para el control de malezas, usar fungicidas o nematicídas (ambos) antes de sembrar y seleccionar cultivares tolerantes o resistentes (Tabla 7).

CONCLUSIÓN

- Se identificaron seis aislados patogénicos asociados a la muerte regresiva del tallo del ñame Florido presentando diferentes niveles de virulencia.
- El aislado identificado morfológicamente como *Colletotrichum*, fue caracterizado molecularmente como *C. queenslandicum*, siendo la primera vez que se reporta esta especie en ñame.
- Se identificó el género *Fusarium* y la especie *F. oxysporum* asociados a esta enfermedad.
- No se logró la identificación de los aislados identificados bajo la familia de las Botriosphareaceae molecularmente.
- Se recomienda desarrollar protocolos para mejorar las prácticas fitosanitarias a nivel de almacenaje del cultivo.

CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN DE LA SENSITIVIDAD DE AISLADOS DE *COLLETOTRICHUM* A AZOXYSTROBIN

INTRODUCCIÓN

Colletotrichum gloeosporioides en su sentido más amplio "sensu lato" es considerado un complejo de especies con una amplia diversidad genética y biológica, agrupado tanto por su similaridad morfológica como genética (Gen ITS- *espaciadores transcritos* internos) (Damm et al., 2010; Pinzón, 2014). En estudios recientes, Fuentes (2015) describió nueve especies de *Colletotrichum* asociadas al cultivo de ñame en Puerto Rico, siete de las cuales son primeros reportes para la isla afectando este cultivo. Esto da paso a que los agricultores necesiten mecanismos de acción más eficientes para el manejo de la antracnosis dada la diversidad de especies de *Colletotrichum* en la isla.

El manejo de esta enfermedad se hace mediante la utilización de fungicidas sistémicos y de contacto de origen biológicos o sintéticos, cultivares resistentes, rotación de cultivos y medidas fitosanitarias (EEA, 1997; Campo, 2011; Kutama et. all, 2013). Entre los fungicidas más utilizados para el control de enfermedades foliares (antracnosis, sigatoka, tizones) en una amplia gama de cultivos están los fungicidas sistémicos que inhiben el sitio QoI (Quinone Outside Inhibitors) del complejo proteínico citocromo *b* (Clough, 1993; Soto et al., 2003; Kunova et al., 2013). El ingrediente activo de este grupo de fungicidas es una estrobilurina que interfiere con la producción de energía (ATP) en las células de los hongos (Vincelli, 2012). Este fungicida está catalogado como "High Resistance" de acuerdo con el código FRAC (FRAC, 2016). En Puerto Rico el único fungicida registrado para combatir esta enfermedad en campo es Quadris® (i.a. Azoxystrobin (AZ)). El azoxystrobin es una estrobilurina, utilizada en cereales, viñas, arroz, cítricos, papas y tomates. Es un fungicida sistémico de amplio espectro, cuya

actividad es dirigida a los cuatro grupos principales de hogos; Ascomicetes, Basidiomicetes, Deuteromicetes y Oomicetes (Anónimo, 2015). La fórmula química de este fungicida son compuestos naturales derribados por los hongos *Oudemansiella mucida* y *Strobillurus tenacellus* (Vincelli, 2002).

No seguir las directrices para reducir los riesgos de desarrollo de resistencia establecido por el código FRAC, ha ocasionado el desarrollo de subpoblaciones resistentes en una diversidad de géneros de hongos (Muiño et al., 2007; Luo, C., & Schnabel, G. 2007; Aguilar-barragan et al., 2014). El primer reporte de resistencia a estrobilurinas fue en el 1998 en el hongo *Blumeria graminis* (Sierotzki et al., 2000). Desde entonces se han caracterizado dos mecanismos de resistencia a los QoI; el anteriormente mencionado, la mutación del gen *b* del citocromo y la respiración alterna (Cruz Avila-Adame, 2003; Fernandez-Ortuño et al., 2008). Según el código FRAC los dos tipos de mutación que pueden ocurrir en el gen de los organismos que desarrollan resistencia son; gen 143A y F129L.

Son pocos los reportes que describen el desarrollo de resistencia a los fungicidas QoI dentro del género *Colletotrichum* (Wong et al., 2007; Ishii, 2004; Avila-Ademe et al., 2003). La resistencia a fungicida QoI fue detectada en 2007 en *Colletotrichum cereale* presentando una sustitución de glicina por alanina en la posición 143 del gen del citocromo b (G143A) (Wong et al., 2007). Igualmente, Avila-Ademe y colaboradores (2003) reportaron aislados resistentes de *C. graminicola* con este tipo de mutaciones de sustituciones de aminoácidos y la utilización de rutas alternas de respiración en los aislados resistentes. En el 2012 la agencia reguladora de la resistencia a fungicidas (FRAC) añadió a *C. graminícola* a la lista de agentes patógenos con resistencia en campo hacia los fungicidas QoI.

Debido a los altos riesgos de desarrollo de resistencia a los fungicidas QoI que existe, el objetivo de esta investigación es evaluar dos especies de *Colletotrichum* asociadas al cultivo de ñame en la isla, para determinar su respuesta a diferentes dosis de Azoxystrobin.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *Colletotrichum gloesporioides* y *Colletotrichum alatae*

Los aislados utilizados en los experimentos *in vitro* proceden de una investigación previamente realizada en la Estación Experimental Agrícola en Isabela (Fuentes, 2015). Estos aislados fueron obtenidos de muestras de hojas colectadas en fincas comerciales ubicadas en el pueblo de Utuado y Moca donde se realizan aplicaciones regulares con Quadris®. El aislado colectado en el pueblo de Moca fue caracterizado como *C. gloesporioides* (No. Accesión KR445668) (Figura 28), mientras que el aislado colectado en el pueblo de Utuado fue descrito como *C. alatae* (No. Accesión KR445671.) (Figura 29). Ambos organismos fueron aislados del follaje de *Dioscorea alata* cv. Florido.

Evaluación de la sensibilidad de *Colletotrichum* spp. a azoxystrobin

Para la evaluación de la sensibilidad de los dos aislados de *Colletotrichum* spp. a estrobilurinas se utilizaron placas Petri con medio de cultivo selectivo (PDA; 39g/L) enmendado con diferentes concentraciones de AZ. Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con 8 tratamientos, 4 réplicas y dos repeticiones. Se utilizaron tres concentraciones de AZ y una concentración de ácido salicil hidroxámico (SHAM), como un inhibidor de la respiración alterna, y la combinación de ambos (Avila-Ademe et al., 2003) (Tabla 11). SHAM fue disuelto en una solución de metanol: acetona 1:1 y el agar PDA fue enmendado con una concentración de 100 µg/ml (Avila-Ademe et al., 2003).

El fungicida y el SHAM fueron añadidos al medio de cultivo luego de ser autoclavado para evitar su descomposición química (Ma et al., 2009). Una vez solidificados los medios enmendados, se colocó un disco de micelio de 3 mm en el centro de la placa y se incubó a 28°C por 7 días. Se midió el diámetro de la colonia cada dos días hasta que el crecimiento micelial cubrió la superficie del plato (8 cm) (Crouch et al., 2009; Rojas et al.2010).

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un DCA para comparar la tasa de crecimiento de los aislados y se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) comparados por un análisis de diferencias mínimas significativas (LSD) con el programa estadístico InfoStat® Versión 2016 (Di Rienzo et al., 2016).

Figura 28. *Colletotrichum gloesporioides* aislado de *Dioscorea. alata* cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días de incubación. (B) Apresorios circulares con márgenes enteros y (C) conidios ovoides, cilíndricos y con ápices obtusos. Barra = 10 μm (Fuentes, 2015).

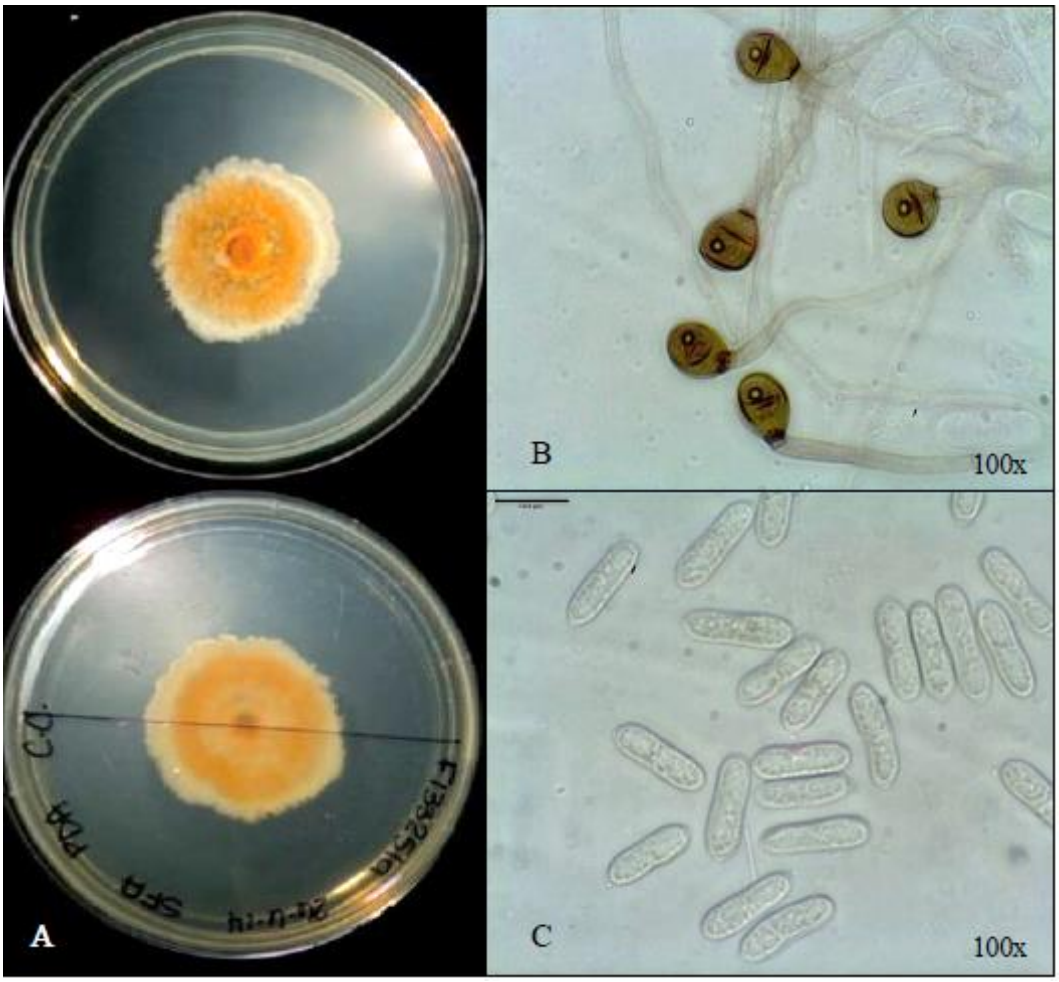


Figura 29. *Colletotrichum alatae* aislado de *Dioscorea alata* cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días de incubación. (B) Apresorios circulares con margen entero y (C) conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm (Fuentes, 2015).

Tabla 11. Tratamientos utilizados para evaluar la respuesta de los aislados de *Colletotrichum* a azoxystrobin.

Tratamientos	Concentraciones[1]	Referencias[2]
1	Medio no enmendado	--[3]
2	Azoxystrobin - 0.1	Wise et al., 2004; Wong and Wilcox, 2002
3	Azoxystrobin - 1	Wise et al., 2004; Wong and Wilcox, 2002
4	Azoxystrobin - 10	Wise et al., 2004; Wong and Wilcox, 2002
5	SHAM – 100	Liang et al., 2015
6	Azoxystrobin - 0.1 + SHAM 100	Wise et al., 2004; Wong and Wilcox, 2002; Liang et al., 2004
7	Azoxystrobin – 1.0 + SHAM 100	Wise et al., 2004; Wong and Wilcox, 2002; Liang et al., 2004
8	Azoxystrobin - 10 + SHAM 100	Wise et al., 2004; Wong and Wilcox, 2002; Liang et al., 2004

[1]Concentraciones en µg/ml.
[2]Concentraciones del fungicida y SHAM, basado en investigaciones anteriores.
[3]Tratamiento control no enmendado.

RESULTADOS

Evaluación de la sensibilidad de *Colletotrichum* spp. a azoxystrobin

Ambos aislados evaluados, *Colletotrichum gloesporioides* y *C. alatae,* presentaron una respuesta de resistencia a las dosis evaluadas de azoxystrobin y la combinación con SHAM. El aislado de *Colletotrichum alatae* resultó tener mayor sensibilidad a azoxystrobin y la combinación con SHAM que el aislado de *C. gloesporioides.*

Colletotrichum alatae, con respecto a la tasa de crecimiento presentó diferencias significativas entre las dosis evaluadas, siendo la combinación de AZ a 10 µg/ml más SHAM a 100 µg/ml la que más efectiva fue reduciendo el crecimiento en ambas repeticiones con respecto al control (Figura 30).

La dosis compuesta de AZ a 10 µg/ml más SHAM a 100 µg/ml fue la más efectiva reduciendo la tasa de crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides*, teniendo resultados similares a *Colletotrichum alatae.* Las dosis evaluadas no presentaron reducción en la tasa de crecimiento, el tratamiento de AZ a 0.1 µg/ml no fue significativamente diferente con respecto al control no enmendado (Figura 31).

Estos experimentos mostraron tener reproducibilidad lo que demuestra la validación de los resultados. Los hongos se dejaron hasta completar el proceso de crecimiento a los 10 días, luego se caracterizaron fenotípicamente las colonias (Figura 32 y 33).

Diferencias fenotípicas de aislados de *Colletotrichum* expuestos a AZ

Los aislados de *Colletotrichum* expuestos a diferentes concentraciones de AZ y SHAM mostraron cambios fenotípicos en el micelio. Para el aislado de *C. alatae* se puede ver el crecimiento típico de este en medio selectivo PDA el cual posee un micelio aéreo color gris claro con anillos concéntricos, masas de conidios color anaranjado (Figura 32-A), en comparación con el tratamiento de SHAM el cual se observa micelio color gris oscuro a negro con tonalidades de anaranjado con poca o ninguna formación de masa de esclerocios (Figura 32-E).

C. gloesporioides no mostró grandes cambios fenotípicos con la excepción del tratamiento AZ 1.0 µg/ml que el micelio creció color blanco con masas de conidios de un color oscuro y la presencia de micro esclerocios (Figura 33-C). En contraste con el tratamiento no enmendado que muestra un micelio color anaranjado a marrón, con masas de conidios y poca o ninguna presencia de micro esclerocios (Figura 33-A).

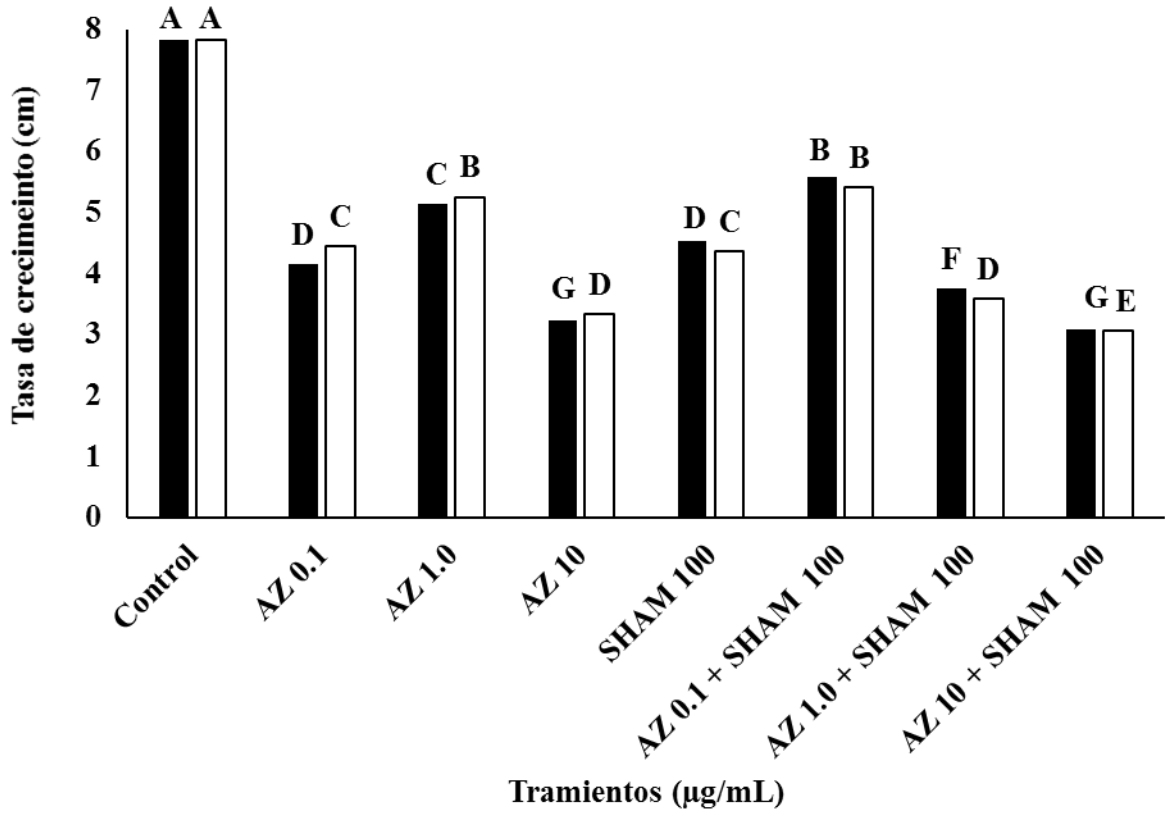


Figura 30. Tasa de crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum alatae* procedente del pueblo de Utuado a AZ luego de 8 días de incubación. Barras negras son del primer experimento y las barras blancas del segundo experimento (Apéndice 9).

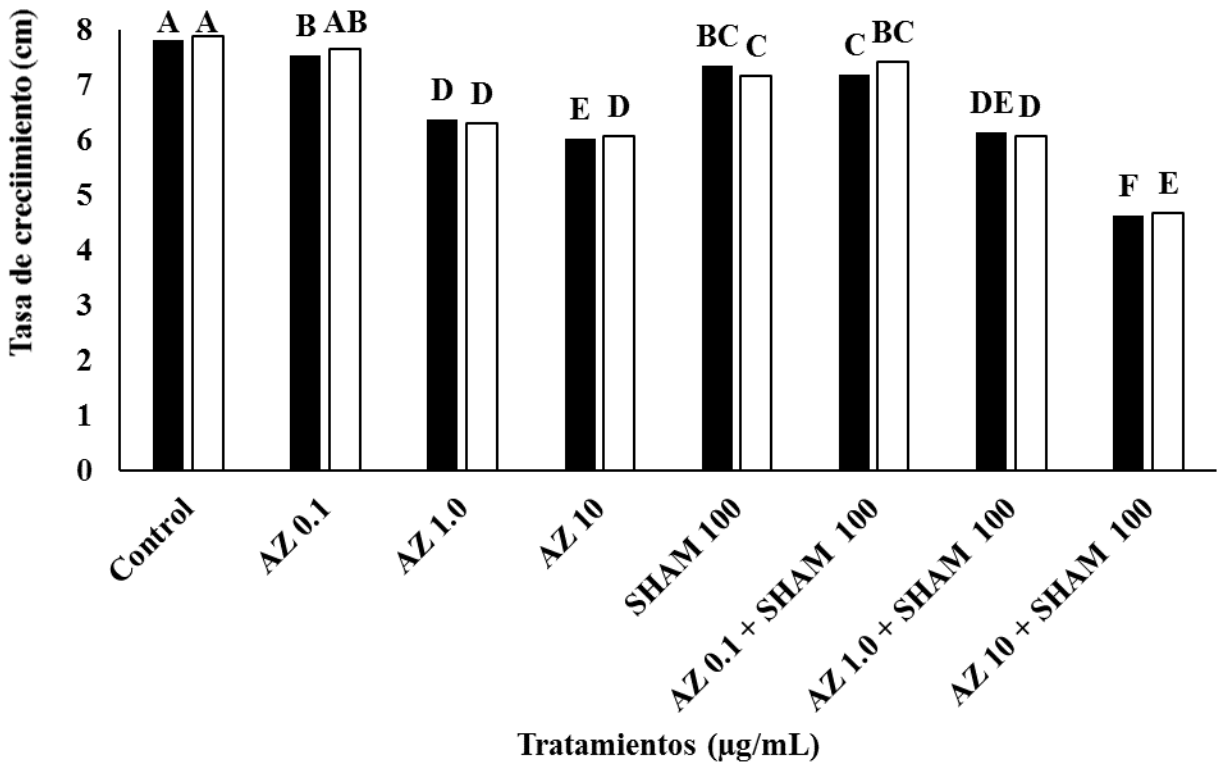


Figura 31. Tasa de crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum gloesporioides* procedente del pueblo de Moca a AZ luego de 8 días de incubación. Barras negras son del primer experimento y las barras blancas son segundo experimento (Apéndice 9).

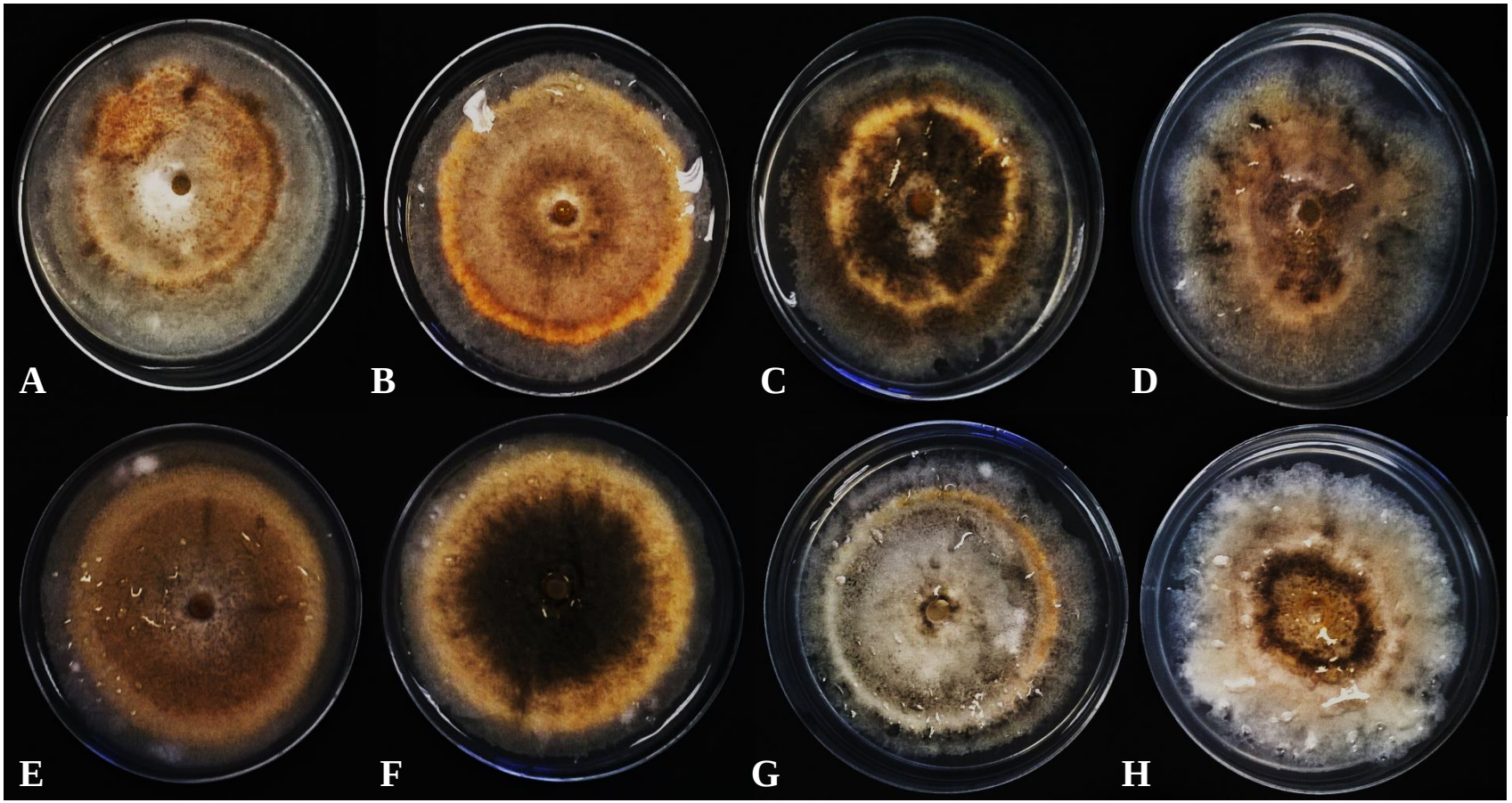


Figura 32. Diferencias en la morfología, producción del micelio, color del micelio y presencia de cuerpos fructíferos asociado a diferentes concentraciones de estrobilurinas para el aislado de *Colletotrichum alatae*. (A) Tratamiento no enmendado, producción normal del micelio y sus estructuras, (B) enmendado con AZ 0.1 µg/ml, cambio en el color de la colonia, (C) enmendado con AZ 1.0 µg/ml, color y forma del micelio diferente , (D) enmendado con AZ 10 µg/ml, micelio aéreo con una tonalidad más blanca, (E) enmienda con SHAM µg/ml, micelio con crecimiento anormal rastrero y tonalidad clara, (F) emendado con AZ 0.1 µg/ml + SHAM µg/ml, se observa coloración oscura del micelio, (G) la enmienda de AZ 1.0 µg/ml + SHAM µg/ml, crecimiento normal del micelio con una tonalidad más oscura y (H) la enmienda de AZ 10 µg/ml + SHAM µg/ml, posee un crecimiento no normal del hongo con crecimiento excesivo de micelio y estructuras bien marcadas.

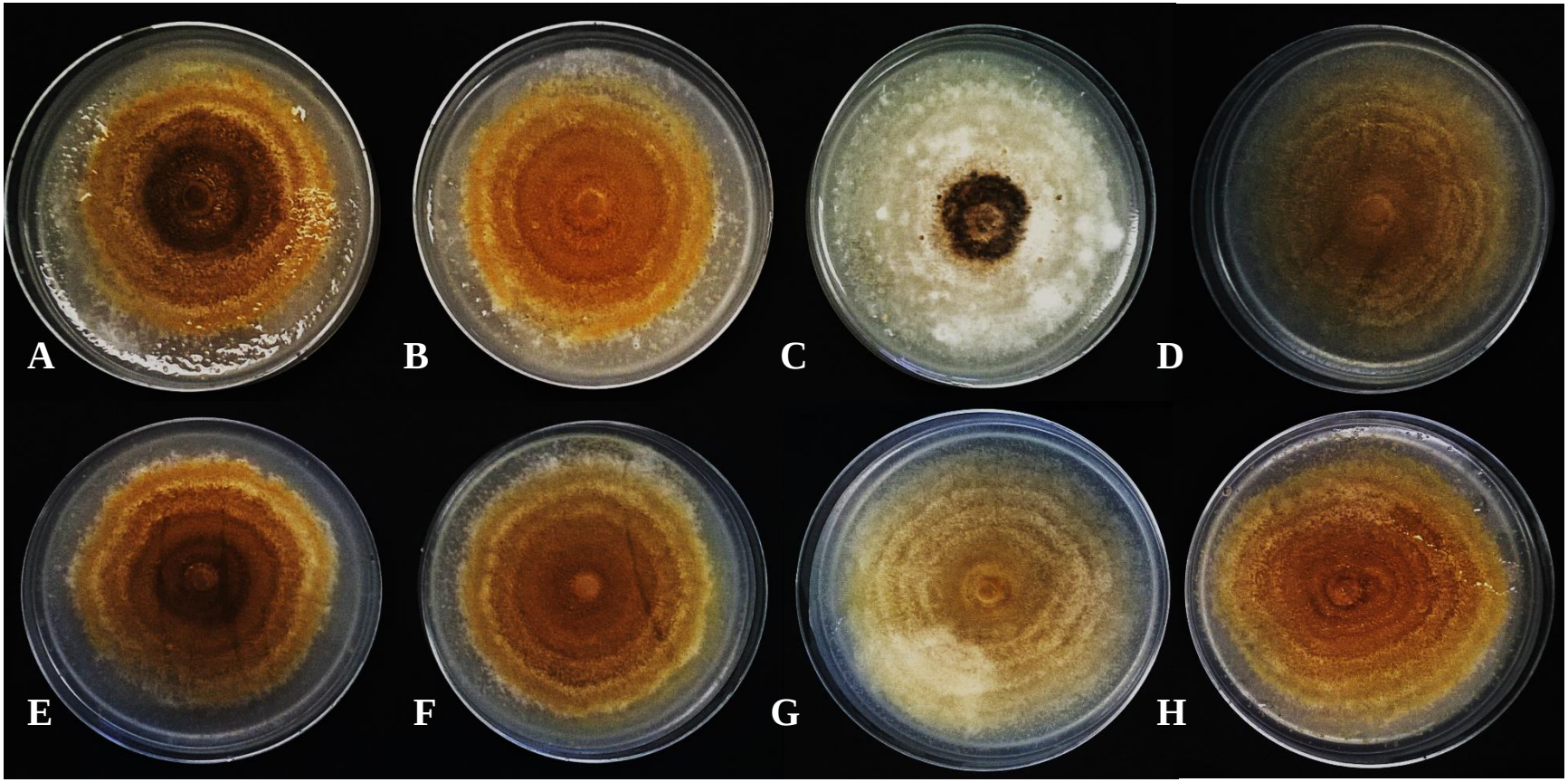


Figura 33. Diferencias en la morfología, producción del micelio, color del micelio y presencia de cuerpos fructíferos asociado a diferentes concentraciones de estrobilurinas para el aislado de *Colletotrichum gloesporioides*. (A) Tratamiento no enmendado, producción normal del micelio, (B) enmendado con AZ 0.1 µg/ml, crecimiento poco menos abundante cambio en color, (C) enmendado con AZ 1.0 µg/ml, color y forma del micelio diferente, (D) enmendado con AZ 10 µg/ml, micelio rastrero con una tonalidad más clara, (E) enmienda con SHAM µg/ml, micelio con crecimiento normal, (F) emendado con AZ 0.1 µg/ml + SHAM µg/ml, se observa coloración típica con un crecimiento poco limitado, (G) la enmienda de AZ 1.0 µg/ml + SHAM µg/ml, crecimiento normal del micelio con una tonalidad más clara y (H) la enmienda de AZ 10 µg/ml + SHAM µg/ml, posee un crecimiento normal del hongo con poca producción de cuerpos fructíferos.

DISCUSIÓN

El uso de fungicidas para el manejo de enfermedades de las plantas es una práctica común que se lleva realizando desde el Siglo IX (Anónimo, 2004). Por ende, el desarrollo de resistencia a fungicidas no es un tema nuevo. La resistencia da como resultado una reducción de la sensibilidad al ingrediente activo de un producto, para un hongo en particular. Esto se debe a un proceso evolutivo desarrollado por el patógeno (McGrath, 2004).

El aislado de *C. alatae* demostró tener una mayor sensibilidad a AZ y SHAM que el aislado de *C. gloesporioides*. Esta respuesta puede estar causada por las diferencias en exposición al AZ de ambos aislados ya que, desde los años 80 se ha demostrado la presencia de *C. gloesporioides* atacando el cultivo del ñame en Puerto Rico y *C. alatae* fue descrita por primera vez en el 2015.

Es importante señalar que ambos aislados crecen a todas las dosis evaluadas y en ninguna de ellas se observó la completa reducción de su crecimiento, lo que sugiere una posibilidad de desarrollo de resistencia tanto para *C. alatae* y *C. gloesporioides* en el cultivo de ñame en Puerto Rico para un fungicida QoI. Este el primer reporte documentado en Puerto Rico donde se presenta el posible desarrollo de resistencia de especies de *Colletotrichum* a este fungicida en este cultivo. En el 1997 Puerto Rico se reportó el desarrollo de resistencia a Benomyl-benlate para tratar antracnosis en el cultivo de ñame en Puerto Rico (Plaguicidas Ingresos y Gastos, 1997).

Según el código FRAC 2016, el AZ posee un alto riesgo de desarrollar resistencia, si es utilizado de manera incorrecta. De igual manera el sitio web del código FRAC demuestra el

desarrollo de resistencia de *Colletotrichum graminicola* en grama, teniendo una mutación en el gen 143A. Este consta en la sustitución del amino ácido glicina por alanina en la posición 143 del gen del citocromo b. Para confirmar la mutación de los genes de resistencia; 143A, F129L del citocromo b y mecanismos adicionales, se necesita realizar análisis moleculares para así corroborar los resultados de esta investigación.

Se observa un cambio fenológico en ambos aislados con respecto a los diferentes tratamientos. *C. alatae* mostró cambios en el color, forma y tipo de crecimiento bajo las diferentes concentraciones de AZ. Efecto similar ocurrido en el hongo *R. stolonifer* el cual mostro cambios fenológicos en el micelio bajo a diferentes concentraciones de quitosano (Alfaro, 2011). Dando paso a que, estos pueden provocar algún efecto en el hongo, pero no de forma directa a su crecimiento, sino afectando su color, tipo de micelio y en las estructuras que este produce en medio artificial.

CONCLUSIÓN

- Se reporta por primera vez la probabilidad de desarrollo de resistencia de aislados de *Colletotrichum* a azoxystrobin en ñame.
- Existen cambios fenotípicos de los aislados una vez expuestos a concentraciones de azoxystrobin.
- Se debe orientar y educar a los agricultores sobre las guías de manejo de resistencia de este producto.
    - FRAC CODE

LITERATURA CITADA

Achar, S., Vasanthakumari, M. M., Parintha, M. y Shivanna, M. B. 2013. *Prevalence and Severity of Anthracnose of Yam (Dioscorea alata and D. bulbifera) caused by Colletotrichum gloesporoides in Bhadra Wildlife Sanctuary in Karnataka*. Journal of Mycology and Plant Pathology 43(3), 282–290.

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Department of Plant Pathology, University of Florida. FifthEdition. 439-500. Elsevier Academic Press.

Aguilar, E. N.D. *Guía del Cultivo de name cv. Diamantes 22.* Ministerio de Agricultura Y Ganaderia de Costa Rica. Costa Rica.

Aguilar-barragan, A., García-torres, A. E., Odriozola-Casas, O., Macedo-Raygoza, G., Ogura, T., Manzo-Sánchez, G., James, A. C., Islas-Flores, I. y Beltran-Garcia, M. 2014. *Chemical management in fungicide sensivity of Mycosphaerella fijiensis collected from banana fields in México*. Bazilian Journal of Microboiology 364, 359–364.

Akem, C. 1999. *Yam Die-back and its Principal Cause in the Yam Belt of Nigeria.* Journal of Biological Sciences, 2(4), 1106 – 1109.

Alfaro, I. 2011. *Cambios morfologicos y fisiologicos inducidos en Rhizopus stolonifer Vuill. por efecto del quitosano, oligoquitosano y aceies escenciales.* Tesis de grado. Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México.

Amiri, A., Bussey, K. E., Riley, M. B., y Schnabel, G. 2008. *Propiconazole inhibits Armillaria tabescens in vitro and translocates into peach roots following trunk infusion*. Plant Disease 92:1293-1298.

Amusa, A. N., Adegbite, A. A., Muhammed, S. y Baiyewu, A. R. 2003. *Yam Diseases and its Management in Nigeria. Institute of Agricultural Research and Training Obafemi Awolowo University, PMB 5029 Moor Plantation, Ibadan. Nigeria*. African Journal of Biotechnology 2 (12): 497-505.

Anónimo, 2015. Ficha técnica. Azoxystrobin. Red de e Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL) http://www.alanwood.net/pesticides/index_rev_frame.html

Anónimo, 2004. Asociación empresarial para la protección de las plantas, Memoria. España.

Anonymous, 2015. Compendium of Pesticide Common Names, en http://www.alanwood.net/pesticides/index_rev_frame.html

Avila-Adame, C., y Köller, W. 2003. *Characterization of spontaneous mutants of Magnaporthe grisea expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin.* Current Genetics 42:332-338.

Avila-Adame, C., Olaya, G., y Köller, W. 2003. *Characterization of Colletotrichum graminicola isolates resistant to strobilurin related QoI fungicides*. Plant Disease 87:1426-1431.

Bailey, J. A., O'connell, R. J., Pring, R. J., Nash, C., y Jeger, M. J. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. *Colletotrichum:* Biology, pathology and control. 88-120.

Balley, L., H. 2015.*Standard Cyclopedia of Horticulture*. New York. The MacMillan Company, 1917.

Baquero, M. y Pérez Castro, L. M. 2002. *Identificación y Caracterización de Colletotrichum spp. como agente causal de la antracnosis en Dioscorea spp.* Tesis de grado. Universidad de Sucre Facultad de Ciencias y Educación Programa de Biología. 10-67.

Bhonde, S.B., Deshpande, S. G. y Sharma, R. N. 1999. In vitro evaluation on inhibitory nature of some neem formulations against plant pathogenic fungi. Hindustan Antibiotic Bulletin 4**:**22-24.

Biles, C. L., Abeles, F. B. y Wilson, C. L. 1990. *The Role of Ethylene in Anthracnose of Cucumber, Cucumis sativus, caused by Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology 80:732-736.

Botanical-Online. (2015). Cultivo del Ñame (*Dioscorea* spp.). http://www.botanicalonline.com/dioscorea_alata_cultivo.htm.

Campo Arana, R. 2011. *Manejo integrado de la antracnosis (Colletotrichum spp.) En ñame (Dioscorea alata), mediante el uso de alternativas para reducir el inoculo primario, la dispersión y el establecimiento del patógeno.* Departamento de Agronomía y Desarrollo Rural, Córdova Colombia. 1-46.

Chaky, J., Anderson, K., Moss, M. y Vaillancourt, L. 2001. *Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination in Colletotrichum graminicola.* Biochemistry and Cell Biology. 558-564.

Charturverdi R, Razdan M. K., y Bhojwani S.S. 2005. *Production of haploids of neem (Azadirachta indica A. Juss) by another culture*. Plant Cell Reproduction 21:531-535.

Chinwuba, P., I. y Odjuvwuederhie, E., I. 2006. Small-Holder Farmers in Southeastern Nigeria, Journal of Central European of Agriculture. *7*:2, 337–342.

Chou, S. T., Chiang, B. H., Chung, Y. C., Chen, P. C. y Hsu, C. K. 2006. *Effects of storage temperatures on the antioxidative activity and composition of yam.* Food Chemistry (98): 618–623.

Choi, Y. W., Hyde, K. D. y Wellcome, W. H. Ho. 1999. *Single spore isolation fungi*. Fungal Diversity 3: 29-38.

Clough. J. M. 1993. *The strobilurins, oudemansins, and myxothiazols, fungicidal derivatives of β-methoxyacrylic acid.* Nat. Prod. Rep. 10:565-574

Crouch, J. A., Clarke, B. B., Jr, White, J. F. y Hillman, B. I. 2009. *Systematic analysis of the falcatespored graminicolous Colletotrichum and a description of six new species from warm-season grasses.*Mycologia 101:5, 717–732. doi:10.3852/08-230

Dai J. V, Yaylan, G. S.V, Raghan J. P. K y Liu Z. 2001. *Multivariate calibration for the determination of total azadirachtin related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanilla assay*. Journal of Agricultural Food Chemistry 49: 1169-1174.

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

Debode, J., Hemelrijck, W. Van, Creemers, P., y Maes, M. 2013. *Effect of fungicides on epiphytic yeasts associated with strawberry.* Micobiologyopen 2 (3): 482-491 http://doi.org/10.1002/mbo3.85

Departamento de Agricultura. 2011. Compendio Estadístico. Oficina de Estadísticas Agrícolas. San Juan, PR. 50 pp.

Departamento de Agricultura, 2014. Consumo de alimentos; Ñame. Departamento de Agricultura de Puerto Rico.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W. InfoStat versión 2016. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

Egesi, C. N., Odu, B. O., Ogunyemi, S., Asiedu, R., y Hughes, J. 2007. *Evaluation of water yam (Dioscorea alata L.) germplasm for reaction to yam anthracnose and virus diseases and their effect on yield.* Journal of Phytopathology, 155:9, 536–543. http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.200

Egesi, C., Onyeka, T. y Asiedu, R. 2009. *Environmental stability of resistance to anthracnose and virus diseases of water yam (Dioscorea alata).* African Journal of Agricultural Research, 4:113–118.

Estación Experimental Agrícola (EEA). 1997. Conjunto tecnológico para la producción de raíces y tubérculos. Publicación; No. 101. Universidad de Puerto Rico.

Everett, K. R., and Timudo-Torrevilla, O. E. 2007. *In vitro fungicide testing for control of Avocado fruit rots.* New Zealand Plant Protection, 60, 99–103.

FAOSTAT. 2013. Food and Agrcultural Organization of the United Nations. *Yams production, Africa.* http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E

FRAC Code. 2013. Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Fungicide Resistance Action Committee. http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4

Feliciano-Rivera, M. 2011. *Efficacy Of Organically Certifiable Materials And Natural Compounds Against Foliar Hemibiotrophic And Necrotrophic Fungi In Cantaloupe And Tomato*. University of Kentucky Doctoral Dissertations. Paper 225. http://uknowledge.uky.edu/gradschool_diss/225

Felsenstein J. 1985. *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.* Evolution 39:783-791.

Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., Vicente, A. De, y Pérez-garcía, A. 2008. *Mechanisms of resistance to QoI fungicides in Phytopathogenic Fung*i. International Microbiology 1: 1–9. http://doi.org/10.2436/20.1501.01.38

Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M. y Elad, Y. 2004. *Trichoderma biocontrol of Colletotrichum acutatum and Botrytis cinerea and survival in strawberry*. European Journal of Plant Pathology, 110(4), 361–370. doi:10.1023/B:EJPP.0000021057.93305.d9

Fuentes, S. 2015. *Caracterización morfológica y molecular de aislados de Colletotrichum sp. en ñame*. Tesis de grado. Universidad de Puerto Rico.

Goh, Tk K 1999. *Single-spore isolation using a han-made glass needle*. Fungal Diversity 2: 47-63

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

González Vélez, A. y Santiago Córdova, M. A. 1989. *Rendimiento y resistencia a la antracnosis de 5 cultivares de ñame, Dioscorea alata Poir in Lam*. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 73(3): 203-208.

González Vélez, A. 2006. *Rendimiento y Reacción Natural de la Antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides) de cuatro cultivares de ñame sembrados sin estacar.* The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 90(1-2): 75-81.

Hagan A. K and Akridge J. R. 2007. *Synthetic and biorational fungicides compared for the control of three foliar diseases of flowering dogwood.* Journal of Environmental Horticulture 25: 157-165.

Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L. y Zhang, J.Z. 2009. *Colletotrichum – names in current use*. Fungal Diversity (39): 147-183.

Icochea, TA.1997. *Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos*. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú. 172p

Ishii H. 2004. *Fungicide resistance: a factor limiting integrated disease control*. Proceedings of the 15th International Plant Protection Congress (ed Guo Yu-yuan) p 216

Issiakhem, F., y Bouznad, Z. 2010. *In vitro evaluation of difenoconazole and chlorothalonil on conidial germination and mycelial growth of Alternaria alternata and A. solani causal agent of early blight in Algeria.* PPO-Special Report no. 14(14), 297–302.

Jarvis A. P. E y Morgan D. 2000. *Analysis of small samples of limonoids of neem (Azadirachta indica) using solid phase extraction from tissue culture.* Photochemistry Analysis, 11: 184-189.

Javaid, A., Akhtar, N., Akbar, M., y Zaman, N. 2007. *In vitro chemical control of Colletotrichum gloesporoides*. INT. J. BIOL. BIOTECH 4(1), 79–81.

Johnson, A. C. S., Jordan, S. A., Gevens, A. J., Pathology, P., y Madison, W. 2015. *Efficacy of Organic and Conventional Fungicides and Impact of Application Timing on Control of Tomato Late Blight Caused by US-22, US-23, and US-24 Isolates of Phytophthora infestans.* Pant Disease 641–647.

Jiménez, D y Hernández, R. 2012. *Manual Técnico: Cultivo del ñame*. Instituto de investigación agropecuaria de Panamá. Panamá.

Keith, L., Matsumoto, T., Street, N., Nishijima, K., Wall, M., y Nagao, M. 2011. *Field Survey and Fungicide Screening of Fungal Pathogens of Rambutan (Nephelium lappaceum) Fruit Rot in Hawaii.* Hort Science 46(5), 730–735.

Kim, Y. S., Dixon, E. W., Vincelli, P., y Farman, M. L. 2003. *Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in Pyricularia grisea caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene.* Phytopathology 93:891-900.

Kimura M. 1980. *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.

Knauf, G., Dahmen, L., Heye, U., y Staub, T. 1995. *Activity of Cyprodinil: Optimal Treatment Timing and Site of Action.* Plant Disease, 79(11), 1096 – 1103. http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959.

Konstantinidou-Doltsinis, S., Markellou, E., Kasselaki, a. M., Fanouraki, M. N., Koumaki, C. M., Schmitt, A. y Malathrakis, N. E. 2006. *Efficacy of Milsana, a formulated plant extract from Reynoutria sachalinensis, against powdery mildew of tomato (Leveillula taurica).* BioControl, 51(3), 375–392. http://doi.org/10.1007/s10526-005-5247-1

Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution (submitted).

Kunova, A., Pizzatti, C., Bonaldi, M., y Cortesi, P. 2014. *Sensitivity of nonexposed and exposed populations of Magnaporthe oryzae from rice to tricyclazole and azoxystrobin*. Plant Disease 98:512-518.

Kutama, A., Auyo, M., Binta, S., Lawan, S., Umar, S., y Fagwalawa, L. 2013. *Combating yam anthracnose in Nigeria: A Review.* Standard Research Journal of Agricultural Sciences 1 (3): 21–26.

Lazarotto, M., Milanesi, P. M., Muniz, M. F. B., Reiniger, L. R. S., Beltrame, R., Harakava, R., y Blume, E. 2014. *Morphological and molecular characterization of Fusarium spp pathogenic to pecan tree in Brazil*. Instituto Biologico de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil, 13(4), 9390–9402.

Liang, H., Di, Y., Li, J., You, H., y Zhu, F (2015). *Baseline Sensitivity of Pyraclostrobin and Toxicity of SHAM to Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 99: 267–273.

Linner, C. S. 2015. *In vitro response of Phomopsis theae to the products of azadiracta indica and extracts of warbugia ugadensis.* Thesis Disertion. Universidad de Keniata. Kenia.

Luo, C., y Schnabel, G. 2007. *Adaptation to Fungicides in Monilinia fructicola Isolates with Different Fungicide Resistance Phenotypes*. Phtopathology 98(2): 230–238.

Ma, H. X., Feng, X. J., Chen, Y., Chen, C. J., y Zhou, M. G. 2009. *Occurrence and characterization of dimethachlon insensitivity in Sclerotinia sclerotiorum in Jiangsu Province of China*. Plant Disease 93:36-42.

MacKenzie, S. J., Mertely, J. C.,y Peres, N. A. 2009. *Curative and protectant activity of fungicides for control of crown rot of strawberry caused by Colletotrichum gloeosporioides.* Plant Disease 93:815-820.

McGrath, M.T. 2004. *¿Qué son los fungicidas?* The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01

Manners JM, Stephenson SA, He C, y Maclean DJ. 2000. *Gene transfer and expression in* Colletotrichum gloeosporioides *causing anthracnose on* Stylosanthes. In: Prusky D, Freeman S, Dickman M, editors. Host Specificity, Pathology and Host–Pathogen Interactions of Colletotrichum. pp. 180–194.

Mignucci, J. S., M. Cordero and H. Cibes, 1985. Enfermedades, plagas, y deficiencias nutricionales de las plantas de ñame. Serv. Ext. Agric. Univ. de Puerto Rico.

Mignucci J. S., Hepperly P. R., Vélez H. y Torres López R. 1988. *Yam Protection: I: Seed-Piece Treatment with Fungicide.* The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico18(2): 185-191.

Mignucci J. S., Hepperly P. R., Green J., Torres López R. y Figueroa L. A. 1988. *Yam Protection II. Anthracnose, yield, and profit of monocultures and interplantings.* The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico72(2): 179-189.

Montaldo, A. 1991. *Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura*. Retrieved from http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A9449E/A9449E.PDF

Norman, D. J., Chen, J., Yuen, J. M. F., Mangravita-Novo, a., Byrne, D., y Walsh, L. 2006. *Control of Bacterial Wilt of Geranium with Phosphorous Acid.* Plant Disease, 90(6), 798–802. http://doi.org/10.1094/PD-90-0798

NCBI handbook [Internet].2016. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2002 Oct. Chapter 18, The Reference Sequence (RefSeq) Project. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/

Opara, L. U. 2003. *Yams: Post-Harvest Operation. Food and Agricultural Organization of the United Nations*. Palmerston North, New Zealand.

PAO/IPPGR. 1989. *Safe Movement of Yam Germplasm: Food & Agriculture Organization and International Board for Plant Genetic Resources Technical Guidelines*. (Eds. AA Brunt, GVH Jackson and EA Prison) pp 19.

Palaniyandi, S. a., Yang, S. H., Cheng, J. H., Meng, L., y Suh, J. W. 2011. *Biological control of anthracnose (Colletotrichum gloeosporioides) in yam by Streptomyces sp.MJM5763.* Journal of Applied Microbiology, 111(2), 443–455. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05048.x

Plaguicidas Ingresos y Gastos. 1997. Suplemento. Conjunto tecnológico para la producción de raíces y tubérculos. Estación Experimental Agrícola, Rio Piedras.

Ponmurugan, P., Baby, U. I., y Gopi, C. 2006. *Efficacy of certain fungicides against Phomopsis theae under in vitro conditions*. African Journal of Biotechnology 5 (5): 434–436.

Raj Bhandari M., Kasai T. y Kawabata J. 2003. *Nutritional evaluation of wild yam (Dioscorea spp.) tubers of Nepal.* Hokkaido I. University, Sapporo 060-8589, Japan 82(4): 619-623.

Román, J., Oramas, D. y Green, J. 1984. *Use of Oxamyl for the Control of Nematodes in Yam (D. rotundata Poir.).* The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico.18(4):383-386.

Rojas, E. I., Rehner, S. A, Samuels, G. J., Van Bael, S. A, Herre, E. A, Cannon, P. y Sha, T. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides associated with Theobroma cacao and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes*. Mycologia, 102(6), 1318–1338. http://doi.org/10.3852/09-244

Rodríguez, W. 2000. *Botánica, domesticación y fisiología del cultivo del ñame (Dioscorea alata).* Agronomía Mesoamericana. 11(2): 133-152.

Sierotzki H, Wullschleger J. y Gisi U. 2000. *Point-mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in Erysiphe graminis f. sp. Tritici field isolates.* Pesticide Biochemistry and Physiology 68:107-112.

Torres López, R. I., Mignucci, J., S., Kok, C. y Saneaux, H. 1986. *Curvularia Leaf Spots of Yams (Dioscorea spp.).* The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 70(4):277-286.

Vincelli, P. 2002. *QoI (Strobilurin) Fungicides: Benefits and Risks.* The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0809-02. Updated, 2012.

Von Chong, K. 2000. *Manejo integrado de las enfermedades foliares del cultivo de ñame.* IDIAP, Panamá.2000.

Waller, J. M. y Bridge, P.D.2000. *Recent advantages in understanding Colletotrichum diseases of some tropical perennial crops. En Colletotrichum: biology, pathology and control.* Bailey, J. Y Jeger, M. Eds. CAB International.

Weir, B. S., Johnston, P. R., y Damm, U. 2012. *The Colletotrichum gloeosporioides species complex.* Studies in Mycology, 73, 115–180. http://doi.org/10.3114/sim0011

Wise, K. A., Bradley, C. A., y Pasche, J. S. 2004. *Baseline Sensitivity of Ascochyta rabiei to Azoxystrobin, Pyraclostrobin, and Boscalid.* Plant Disease 92 (2): 295-300.

Wong, F. P., Midland, S. L., y De la Cerda, K. A. 2007. *Occurrence and distribution of QoI-resistant isolates of Colletotrichum cereal from annual bluegrass in California*. Plant Disease 91:1536-1546.

Wong, F. P., y Wilcox, W. F. 2002. *Sensitivity to azoxystrobin among isolates of Uncinula necator: Baseline distribution and relationship to myclobutanil sensitivity*. Plant Disease 86:394- 404.

Yanase, Y., Kishi, J., Inami, S., Katsuta, H., y Yoshikawa, Y. 2013. *Biological activity and disease controlling efficacy of penthiopyrad*. Journal of Pesticide Science, 38(4), 188–193. http://doi.org/10.1584/jpestics.D12-063

Apéndice 1.
Medios de cultivos

1 – A

Medio PDA (Agar de papa y dextrosa)

-Agar de Papa Dextrosa …… **39g**

-Agua destilada …… 1 L

Mezclar bien por un minuto y colocar en autoclave a 121°C por 35 minutos.

1 – B

Medio NA (Nutrient Agar)

-Agar Nutritivo …… 23g

-Agua destilada …… 1 L

Mezclar bien por un minuto y colocar en autoclave a 121°C por 35 minutos.

1 – C

Medio GBA (Agar de Habichuelas Tiernas)

-Habichuelas tiernas …… 14 onz

-Agar en polvo …… 20g

-Agua destilada …… 1 L

Suspender las 14 oz de habichuelas tiernas en un procesador de alimentos y añadir 200 mL de agua destilada. Triturar y verter en un matraz con el agar, mezclar bien por un minuto y completar con
agua hasta 1 L. Colocar en autoclave a 121°C por 35 minutos.

1 – D

Medio PDB (Caldo de Papa Dextrosa)

-Caldo de papa y dextrosa ……… **24g**

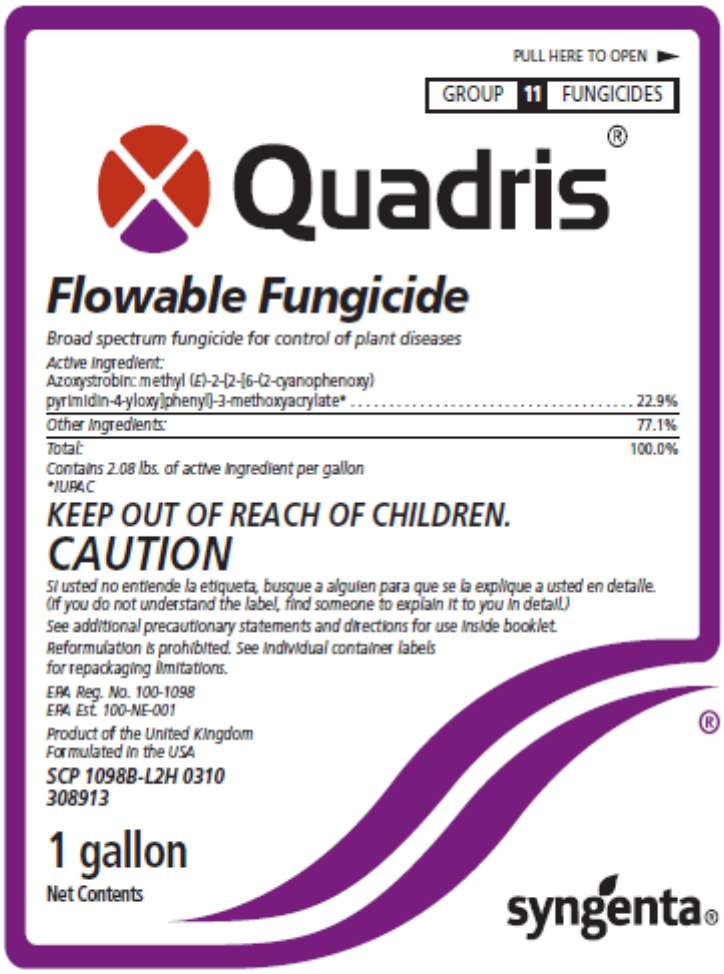
-Agua destilada …… 1 L

Mezclar bien por un minuto y colocar en autoclave a 121°C por 35 minutos.

Apéndice 2.
Etiqueta de los fungicidas utilizados en los experimentos *in vitro* e *in vivo*

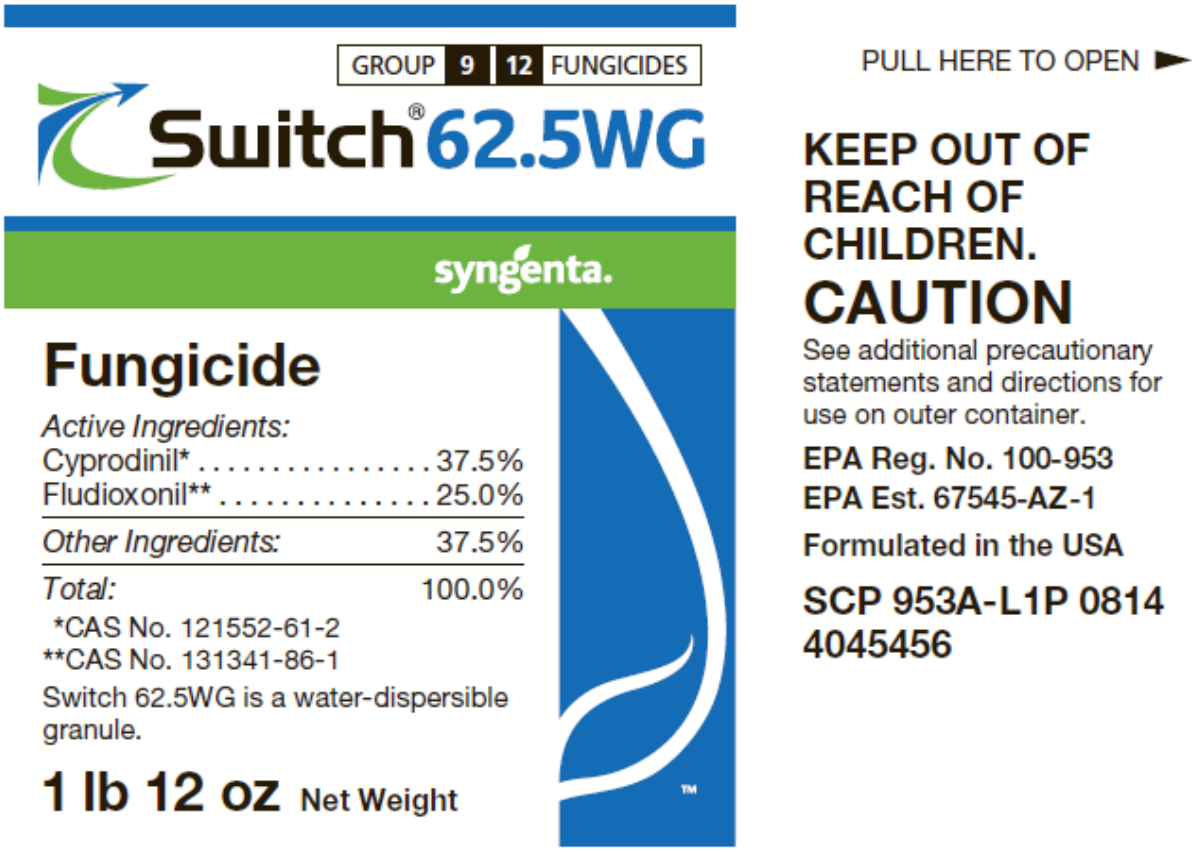
2 – A

Quadris®


PULL HERE TO OPEN
GROUP 11 FUNGICIDES
Quadris®
Flowable Fungicide
Broad spectrum fungicide for control of plant diseases
Active Ingredient:
Azoxystrobin: methyl (E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)
pyrimidin-4-yloxy]phenyl]-3-methoxyacrylate* 22.9%
Other Ingredients: 77.1%
Total: 100.0%
Contains 2.08 lbs. of active ingredient per gallon
*IUPAC
KEEP OUT OF REACH OF CHILDREN.
CAUTION
Si usted no entiende la etiqueta, busque a alguien para que se la explique a usted en detalle.
(If you do not understand the label, find someone to explain it to you in detail.)
See additional precautionary statements and directions for use inside booklet.
Reformulation is prohibited. See individual container labels
for repackaging limitations.
EPA Reg. No. 100-1098
EPA Est. 100-NE-001
Product of the United Kingdom
Formulated in the USA
SCP 1098B-L2H 0310
308913
1 gallon
Net Contents
syngenta®

2 – B

Switch® 62.5 WG



2 – C

Fontelis™

DuPont™
Fontelis™

fungicide

GROUP	7	FUNGICIDE

Suspension Concentrate

Active Ingredient	***By Weight***
Penthiopyrad	20.4%
Other Ingredients	79.6%
TOTAL	100.0%

Contains 1.67 pounds of penthiopyrad per gallon of product

EPA Reg. No. 352-834 EPA Est. No. _____

Nonrefillable Container
Net: _____
OR
Refillable Container
Net: _____

KEEP OUT OF REACH OF CHILDREN

CAUTION

Si usted no entiende la etiqueta, busque a alguien para que se la explique a usted en detalle. (If you do not understand the label, find someone to explain it to you in detail).

FIRST AID

IF SWALLOWED: Call a poison control center or doctor immediately for treatment advice. Have person sip a glass of water if able to swallow. Do not induce vomiting unless told to by a poison control center or doctor. Do not give anything to an unconscious person.

Have the product container or label with you when calling a poison control center or doctor, or going for treatment. **For medical emergencies involving this product, call toll-free 1-800-441-3637.** See Label for Additional Precautions and Directions for Use.

PRECAUTIONARY STATEMENTS

HAZARDS TO HUMANS AND DOMESTIC ANIMALS

CAUTION

Prolonged or frequently repeated skin contact may cause allergic reactions in some individuals. May be harmful if swallowed. Wash thoroughly with soap and water after handling and before eating, drinking, chewing gum, using tobacco, or using the toilet.

2 – D

Chlorothalonil® 720

2 – E

Kocide® 3000

DuPont™ Kocide® 3000

fungicide/bactericide

Dry Flowable

Active Ingredients	***By Weight***
Copper Hydroxide* (CAS No. 20427-59-2)	46.1%
Inert Ingredients	53.9%
TOTAL	100.0%

(* Metallic Copper Equivalent 30%)

EPA Reg. No. 352-662 EPA Est. No._____

Nonrefillable Container

Net: _____

OR

Refillable Container

Net: _____

KEEP OUT OF REACH OF CHILDREN

CAUTION

FIRST AID

IF IN EYES: Hold eye open and rinse slowly and gently with water for 15-20 minutes. Remove contact lenses, if present, after the first 5 minutes, then continue rinsing eye. Call a poison control center or doctor for treatment advice.

IF SWALLOWED: Call a poison control center or doctor immediately for treatment advice. Have person sip a glass of water if able to swallow. Do not induce vomiting unless told to do so by the poison control center or doctor. Do not give anything by mouth to an unconscious person.

IF INHALED: Move person to fresh air. If person is not breathing, call 911 or an ambulance, then give artificial respiration, preferably mouth-to-mouth if possible. Call a poison control center or doctor for further treatment advice.

IF ON SKIN: Take off contaminated clothing. Rinse skin immediately with plenty of water for 15-20 minutes. Call a poison control center or doctor for treatment advice.

Have the product container or label with you when calling a poison control center or doctor, or going for treatment. You may also contact 1-800-441-3637 for emergency medical treatment information.

NOTE TO PHYSICIAN: Probable mucosal damage may contraindicate use of gastric lavage.

See Label for Additional Precautions and Directions for use.

PRECAUTIONARY STATEMENTS

HAZARDS TO HUMANS AND DOMESTIC ANIMALS

CAUTION

Causes moderate eye irritation. Harmful if swallowed, absorbed through the skin or inhaled. Do not get in eyes, skin, or on clothing. Avoid breathing dust. Wash thoroughly with soap and water after handling.

PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT (PPE)

Some materials that are chemical-resistant to this product are listed below. If you want more options, follow the instructions for category A on an EPA chemical resistance category selection sheet.

2 – F

Kphite® 7 LP

K-PHITE® 7LP

SYSTEMIC FUNGICIDE BACTERICIDE

K-PHITE 7LP Fungicide is a systemic fungicide for the control of Downy Mildew, Phytophthora Pythium and Various Other Diseases on agricultural and commercial sod turf.

ACTIVE INGREDIENTS:

Mono- and di-potassium salts of Phosphorous Acid*	56%
OTHER INGREDIENTS:	44%
TOTAL:	100%

*Contains 7.03 lbs./gallon of the active ingredients, mono- and di-potassium salts of Phosphorous Acid. Equivalent to 4.41 lbs. phosphorous Acid/gallon.

EPA REG. NO. 73806-FL-001

PRECAUTIONARY STATEMENTS HAZARDS TO HUMANS AND DOMESTIC ANIMALS

CAUTION

Harmful if absorbed through skin. Causes moderate eye irritation. Avoid contact with eyes, skin or clothing. Wear long-sleeved shirt and long pants, socks and shoes, and waterproof gloves. Wash hands before eating, drinking, chewing gum, using tobacco or using the toilet.

FIRST AID STATEMENTS

If on skin or clothing:
Take off contaminated clothing. Rinse skin immediately with plenty of water for 15-20 minutes. Call a poison control center or doctor for treatment advice.

If swallowed:
Call a poison control center or doctor immediately for treatment advice. Have person sip a glass of water if able to swallow. Do not induce vomiting unless told to do so by a poison control center or doctor. Do not give anything by mouth to an unconscious person.

If in eyes:
Hold eye open and rinse slowly and gently with water for 15-20 minutes. Remove contact lenses, if present, after the first 5 minutes, then continue rinsing eye. Call a poison control center or doctor for treatment advice.

USER SAFETY RECOMMENDATIONS

Users should:
- Wash hands before eating, drinking, chewing gum, using tobacco or using the toilet.
- Remove PPE clothing immediately if pesticide gets inside. Then wash thoroughly and put on clean clothing.

ENVIRONMENTAL HAZARDS

Do not apply directly to water, to areas where surface water is present or to intertidal areas below the mean high water mark. Do not contaminate water when disposing of rinsate or equipment wash waters.

DIRECTIONS FOR USE

It is a violation of Federal Law to use this product in a manner inconsistent with its labeling. Read entire label before using this product.
Do not apply this product in a way that will contact workers or other person, either directly or through drift.

NON-AGRICULTURAL USE REQUIREMENTS

The requirements of this box apply to uses of this product that are NOT within the scope of the Worker Protection Standard for agricultural pesticides (40 CFR Part 170). The WPS applies when this product is used to produce agricultural plants on farms, forests, nurseries, or greenhouses. Do not enter treated areas without protective clothing until spray has dried.

GENERAL APPLICATION INSTRUCTIONS

K-PHITE 7LP Fungicide may be applied by various application methods, including foliar sprays, soil drench, soil incorporation, and bare root dip. For foliar sprays, apply **K-PHITE 7LP Fungicide** with sufficient water for adequate coverage of foliage, according to crop and growth stage. To insure good coverage, spray to wet.

MIXING INSTRUCTIONS

1. Fill the spray tank with 1/2 of the required volume of water.
2. Add **K-PHITE 7LP Fungicide** slowly to the tank and agitate by hydraulic or mechanical means.
3. Continue to fill the tank with water to the desired volume while agitating.
4. Continue agitation when applying.

COMPATIBILITY

K-PHITE 7LP Fungicide is compatible with most pesticide products used in agriculture; however, crop sensitivity to these mixtures may vary. If these combinations or others have not been previously used, do not tank mix without first testing the mixture's compatibility nor apply it without assessing its safety to the crop (phytotoxicity).

The use of spray adjuvants (i.e. stickers, spreaders, wetting agents) is not recommended with **K-PHITE 7LP Fungicide**. However if an adjuvant is used with **K-PHITE 7LP Fungicide** it should be tested before use for compatibility. Do not use acidifying type compatibility agents.

To determine the compatibility of **K-PHITE 7LP Fungicide** with other products, use a jar compatibility test. Add the correct proportions of each product and the appropriate quantity of water to clean container, thoroughly mix, then let stand for 3-5 minutes. If the mixture remains in solution or can be remixed readily, the products are considered compatible. To determine if a combination is phytotoxic to a specific crop, spray a few plants/trees, then evaluate 3-7 days later for visual symptoms.

SPECIMEN

Plant Food Systems P.O. Box 775 • Zellwood, Florida 32798 • 407-889-7755 • www.plantfoodsystems.com

2 – G
Trilogy®

Trilogy®

FUNGICIDE/MITICIDE/INSECTICIDE

For use on vegetables, fruits, nuts, melons, outdoor ornamental plants and agronomic crops.
For foliar control of fungal disease and insect pests.
Can be Used Up to Day of Harvest

OMRI Listed

FOR ORGANIC PRODUCTION

ACTIVE INGREDIENT:

Clarified Hydrophobic Extract of Neem Oil	70%
OTHER INGREDIENTS	30%
TOTAL	100%

This product contains 5.46 lb of clarified hydrophobic extract of neem oil per US gallon.

This container will treat up to 0.5 acres when used at the highest application rate (only for containers less than 5 gallons).

KEEP OUT OF REACH OF CHILDREN
CAUTION

See Inside Panels for Additional Precautionary Statements, Directions for Use, Storage and Disposal Statements, and WARRANTY

Net Contents:
2.5 gallons and 250 gallons

EPA Reg. No. 70051-2
EPA Est. No.70051-CA-001

Composition covered by US Patents 5,298,251; 5,356,629; 5,372,817; 5,405,612; and 5,409,708.

Lot No.:

Manufactured by
Certis USA, L.L.C.
9145 Guilford Road
Suite 175
Columbia, MD 21046

CERTIS

PRECAUTIONARY STATEMENTS
HAZARDS TO HUMANS AND DOMESTIC ANIMALS
CAUTION
Harmful if absorbed through the skin. Causes moderate eye irritation. Avoid contact with skin, eyes, or clothing. Wash thoroughly with soap and water after handling and before eating, drinking, chewing gum, or using tobacco. Remove and wash contaminated clothing before reuse.

FIRST AID
If on skin or clothing: Take off contaminated clothing. Rinse skin immediately with plenty of water for 15-20 minutes.

If in eyes: Hold eye open and rinse slowly and gently with water for 15-20 minutes. Remove contact lenses, if present, after the first 5 minutes, then continue rinsing eye.

Call a poison control center or doctor for treatment advice. Have the product container or label with you when calling a poison control center or doctor, or going for treatment. Hot Line Number: 1-800-255-3924.

Personal Protective Equipment:
Some materials that are chemical-resistant to this product are listed below. If you want more options, follow the instructions for category C on an EPA chemical resistance category selection chart.

Applicators and other handlers must wear:
- Long-sleeved shirt and long pants.
- Chemical-resistant gloves, such as barrier laminate or butyl rubber or nitrile rubber or neoprene rubber or polyvinyl chloride (PVC) or Viton.
- Shoes plus socks.

Follow the manufacturer's instructions for cleaning/maintaining PPE. If no such instructions for washables, use detergent and hot water. Keep and wash PPE separately from other laundry.

User Safety Recommendations:
Users should:
- Remove clothing/PPE immediately if pesticide gets inside. Then wash thoroughly and put on clean clothing.
- Remove PPE immediately after handling this product. Wash the outside of gloves before removing. As soon as possible, wash thoroughly and change into clean clothing.

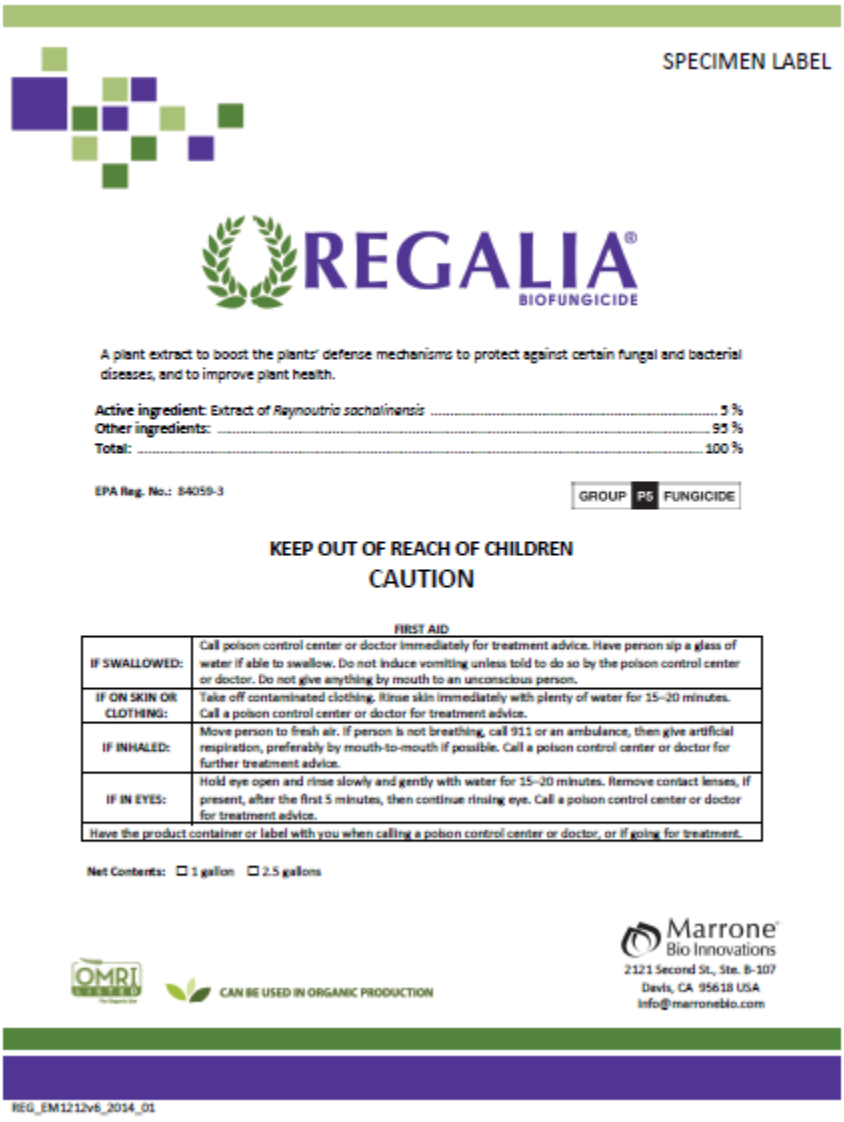
ENVIRONMENTAL HAZARDS
This product is hazardous to fish and aquatic invertebrates. For Terrestrial Uses: Do not apply directly to water, or to areas where surface water is present, or to intertidal areas below the mean high water mark. Do not contaminate water when disposing of equipment washwater or rinsate.

BEE HAZARD
This product is toxic to bees exposed to direct treatment. Do not apply this product while bees are actively visiting the treatment area.

PHYSICAL AND CHEMICAL HAZARDS
Do not use or store near heat or open flame.

1

2 – H
Regalia®



SPECIMEN LABEL

REGALIA®

BIOFUNGICIDE

A plant extract to boost the plants' defense mechanisms to protect against certain fungal and bacterial diseases, and to improve plant health.

Active ingredient: Extract of *Reynoutria sachalinensis* ..... 5 %
Other ingredients: ..... 95 %
Total: ..... 100 %

EPA Reg. No.: 84059-3

GROUP P5 FUNGICIDE

KEEP OUT OF REACH OF CHILDREN

CAUTION

FIRST AID

IF SWALLOWED:	Call poison control center or doctor immediately for treatment advice. Have person sip a glass of water if able to swallow. Do not induce vomiting unless told to do so by the poison control center or doctor. Do not give anything by mouth to an unconscious person.
IF ON SKIN OR CLOTHING:	Take off contaminated clothing. Rinse skin immediately with plenty of water for 15–20 minutes. Call a poison control center or doctor for treatment advice.
IF INHALED:	Move person to fresh air. If person is not breathing, call 911 or an ambulance, then give artificial respiration, preferably by mouth-to-mouth if possible. Call a poison control center or doctor for further treatment advice.
IF IN EYES:	Hold eye open and rinse slowly and gently with water for 15–20 minutes. Remove contact lenses, if present, after the first 5 minutes, then continue rinsing eye. Call a poison control center or doctor for treatment advice.
Have the product container or label with you when calling a poison control center or doctor, or if going for treatment.	

Net Contents: ☐ 1 gallon ☐ 2.5 gallons

OMRI LISTED

CAN BE USED IN ORGANIC PRODUCTION

Marrone Bio Innovations
2121 Second St., Ste. B-107
Davis, CA 95618 USA
info@marronebio.com

REG_EM1212v6_2014_01

Apéndice 3.
Brotación de los primeros tres meses de siembra y desarrollo de la epidemia.

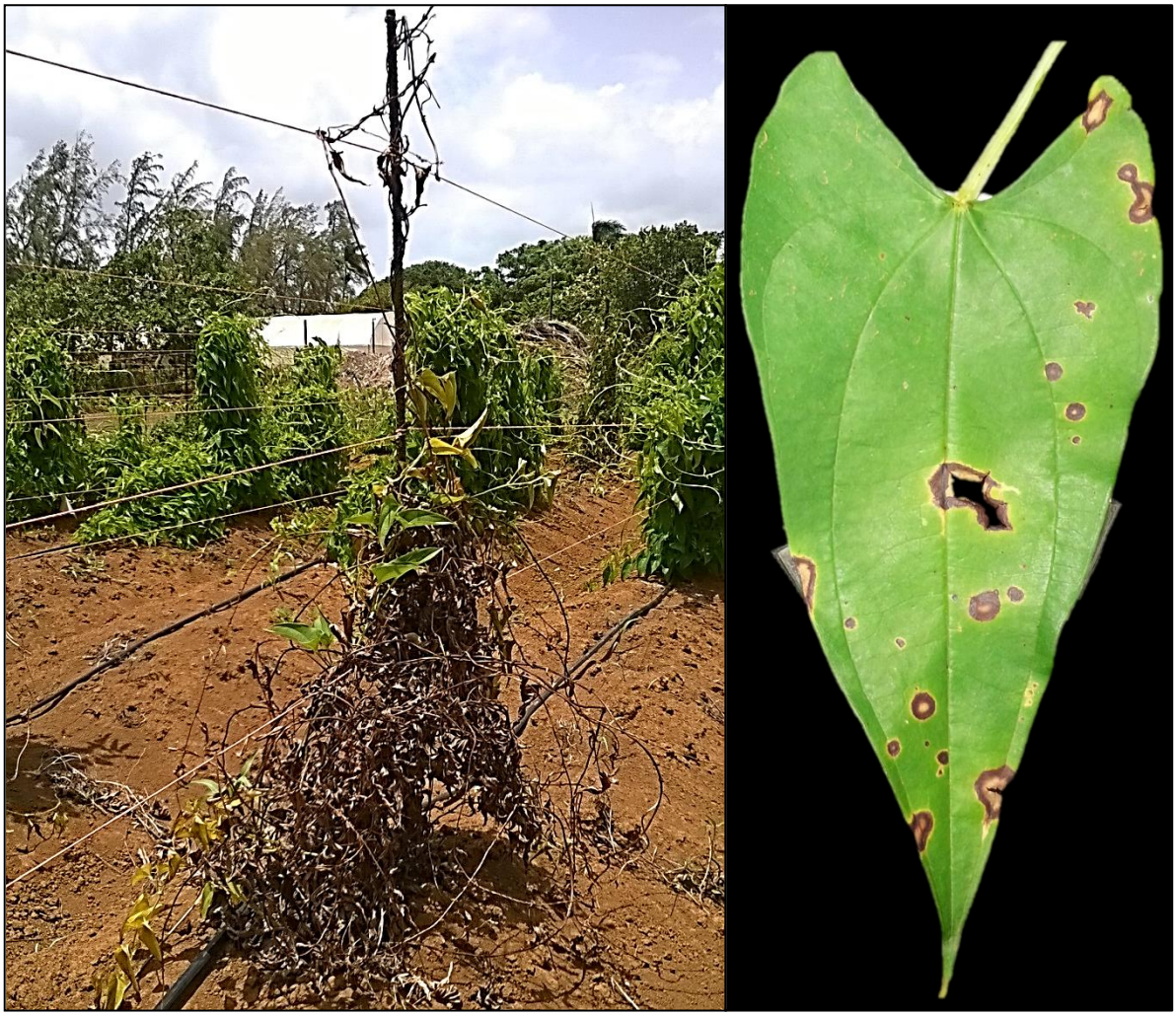
3 – A
7 de mayo de 2015

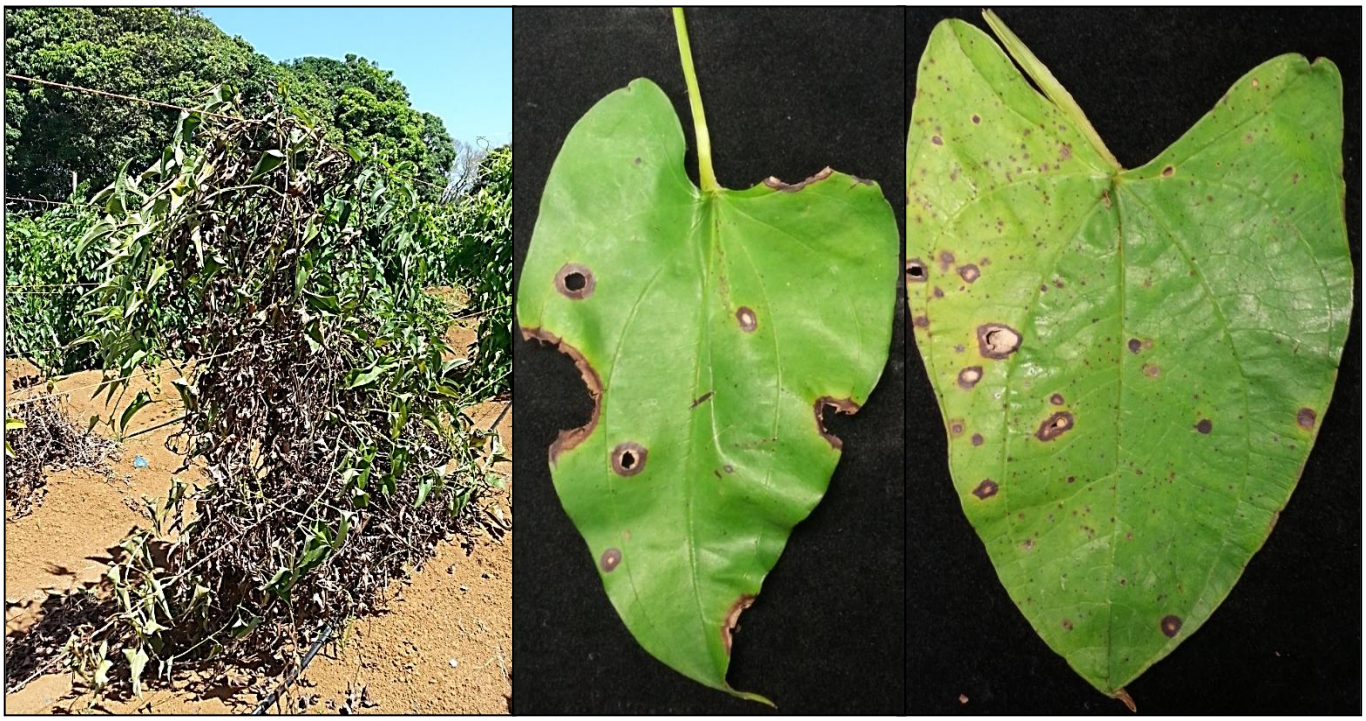
3 – B
8 de junio de 2015

3 – C
8 de julio de 2015

3 – D

Desarrollo de la epidemia



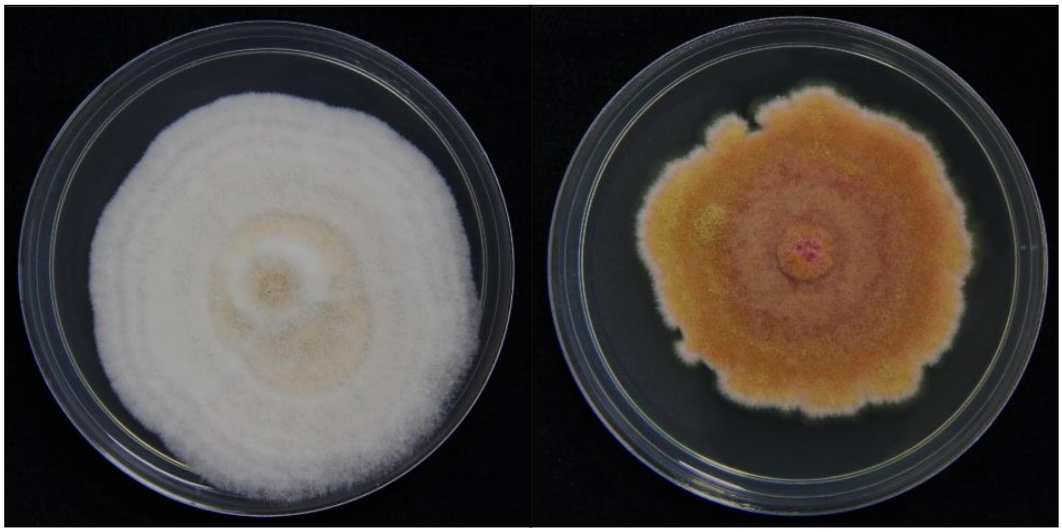


Apéndice 4.
Aislados encontrados a nivel de campo en el cultivar Florido

4 – A

4 – B

4 – C



Apéndice 5.
Análisis estadísticos: Evaluación *in vitro* e *in vivo*

5– A
Datos Rendimientos

Análisis de la varianza

Rendimiento

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Rendimiento	40	0.33	0.03	37.16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	187668673.90	12	15639056.16	1.09	0.4066
Bloque	92212022.87	3	30737340.96	2.14	0.1184
Tratamiento	95456651.03	9	10606294.56	0.74	0.6707
Error	387619589.88	27	14356281.11		
Total	575288263.78	39			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=3476.78161

Error: 14356281.1065 gl: 27

Bloque	Medias	n	E.E.		
1	8007.50	10	1198.18	A	
4	9586.20	10	1198.18	A	B
2	11331.60	10	1198.18	A	B
3	11860.40	10	1198.18		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5497.27441

Error: 14356281.1065 gl: 27

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
4	7579.25	4	1894.48	A	
9	8622.25	4	1894.48	A	B
1	9216.50	4	1894.48	A	B
5	9334.00	4	1894.48	A	B
3	9897.75	4	1894.48	A	B
8	10456.00	4	1894.48	A	B
6	10759.50	4	1894.48	A	B
2	11370.75	4	1894.48	A	B
7	11474.75	4	1894.48	A	B
10	13253.50	4	1894.48		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

5 – B
Datos de AUDPC estandarizado (SAUDPC)

SAUDPC

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
SAUDPC	40	0.39	0.12	14.43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	105.52	12	8.79	1.43	0.2133
Bloque	14.76	3	4.92	0.80	0.5052
Tratamiento	90.76	9	10.08	1.64	0.1543
Error	166.22	27	6.16		
Total	271.74	39			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.27675

Error: 6.1563 gl: 27

Bloque	Medias	n	E.E.	
2	16.17	10	0.78	A
1	17.33	10	0.78	A
3	17.51	10	0.78	A
4	17.75	10	0.78	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=3.59986

Error: 6.1563 gl: 27

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
10	13.93	4	1.24	A		
1	16.10	4	1.24	A	B	
7	16.30	4	1.24	A	B	C
6	16.65	4	1.24	A	B	C
2	17.18	4	1.24	A	B	C
9	17.55	4	1.24		B	C
3	17.80	4	1.24		B	C
8	18.08	4	1.24		B	C
4	18.58	4	1.24		B	C
5	19.75	4	1.24			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

5 – C
Datos del último día de severidad

Último

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Ultimo	40	0.58	0.40	5.39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	247.21	12	20.60	3.13	0.0067
Bloque	37.69	3	12.56	1.91	0.1517
Tratamiento	209.53	9	23.28	3.54	0.0051
Error	177.56	27	6.58		
Total	424.78	39			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.35315

Error: 6.5764 gl: 27

Bloque	Medias	n	E.E.	
2	46.48	10	0.81	A
4	46.70	10	0.81	A
1	48.38	10	0.81	A
3	48.65	10	0.81	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=3.72066

Error: 6.5764 gl: 27

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
10	41.63	4	1.28	A		
7	45.25	4	1.28	A	B	
6	47.06	4	1.28		B	C
1	48.31	4	1.28		B	C
9	48.31	4	1.28		B	C
8	48.88	4	1.28		B	C
3	48.88	4	1.28		B	C
2	48.88	4	1.28		B	C
5	48.88	4	1.28		B	C
4	49.44	4	1.28			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Apéndice 6.
Extracción de ADN y Purificación del producto de PCR

6 – 1
Extracción de ADN
1. Encender baño de María (NESLAB instruments, R134A) a 65°C.
2. Colectar micelio y colocarlo en los tubos de 1.5µL con perlas de cristales estériles.
3. Colocar los tubos en Gene Disruptor para romper el tejido.
4. Añadir 400 µLdel buffer AP1 y 4 µLde RNAsa a cada tubo.
5. Incubar a 65°C por 1 hora.
6. Centrifugar por 2 minutos a 13,500 rpm.
7. Colectar 200 µLdel sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo.
8. Añadir 130 µLde la solución P3.
9. Invertir el tubo varias veces y colocar en hielo por 5 minutos.
10. Centrifugar por 5 minutos a 13,500 rpm.
11. Vaciar el contenido del tubo en una columna violeta.
12. Centrifugar por 2 minutos a 13,500 rpm.
13. Transferir 200 µLdel sobrenadante a una columna translucida.
14. Añadir 300 µLde AW1 y mezclar con la pipeta sin tocar el filtro.
15. Centrifugar por 2 minutos a 13,500 rpm.
16. Descartar el líquido que paso a través de la columna y guardar el tubo con el filtro.
17. Añadir 500 µLdel buffer AW2.
18. Centrifugar por 2 minutos a 13,500 rpm.
19. Eliminar el tubo de recolección y colocar el filtro en un tubo nuevo.
20. Añadir 50 µLdel buffer AE.
21. Dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.
22. Centrifugar por 1 minuto a 13,500 rpm.
23. No descartar el sobrenadante (ADN).
24. Dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.
25. Centrifugar por 1 minuto a 13,500 rpm.
26. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
27. Calcular concentración de ADN.

6 – B

Purificación de ADN del producto de PCR.

1. Unir los dos productos de PCR de cada muestra, debería quedar un total de 40 µL de este producto.
2. Rotular las columnas violetas con sus respectivos códigos y añadir 200 µL de buffer QG a cada una de estas.
3. Añadir a estas columnas los 40 µL del producto de PCR.
4. Centrifugar a 8,000 rpm por un minuto.
5. Desechar el líquido que paso a través de la columna.
6. Añadir 750 µL del buffer PE y dejar reposar por tres minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 8,000 rpm por un minuto.
8. Desechar el líquido que paso a través de la columna.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por un minuto.
10. Colocar el filtro en un microtubo de 1.5 mL.
11. Añadir 25 µL del buffer EB.
12. Dejar reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar a 8,000 rpm por un minuto.
14. Medir concentración del ADN.

Apéndice 7.
Secuencias de hongos asociados a la muerte regresiva del tallo

7 – A

Secuencicias

>Aislado HI – Gen ITS

TGATCCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGTTTAACGGCGTGGCCGCGACGATTACCA
GTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCAATTTG
AGGAACGCGAATTAACGCGAGTCCCAACACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGA
CGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAT
TCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTAC
TCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTT
ACCGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAAGTGGTATGTTCACAGGGGTTTGGG
AGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGA
TTTTACTTCCAAACTTTTACTTCCATTCCCAAAAATCCCTTTGATAAAAGGAAAAACC
AAGGGGGGGCCCTTAACCGAACCCGGGCAAAAGTTTAAAAAAAATTTCCCACCCGG
GGGAAAAATTTTTTTAAGAAAAAAAAAAAACCCTTTTTTAAAATTTTTTTTTTGACA
AATTTTAAAGGTCCTTCCCCGGGGTCCCCCCCGGAAACCTTTTTTCAATTTTTTTTTTC
AAAATAAGGCATAACAGGGAAGACAAAAAATTAAAGTTCAACA

>Aislado H1 – Gen β-tubulina

GCGCGTTCCGGACACTGACTGGCCGCAAAGAAGTTGTCGGGGTGGAAGAGCAGGCC
GAAAGGACCAGGCACGGACAGGCGTACATGGTACCGGGCTAAAAGTCGACGAGGG
GGTAACATGCGTGAGACTATAACGGGCGGATTGTAAGTACCTCTCTTTTTAAGTTCG
TGTTGTGCTGTTGCACGCGTTGAGTTTATCATGCCCCTGATTCTACCCCGCTGGGCGG
TGGCAGCTCAACGACAATGCACGATAGCTACCAGCTTTACCATACCTTCTGTCAAGA
CAAGAAGCTAATCAGATCTCTTCTCTACAATAGGTTCACCTCCAGACCGGTCAGTGC
GTAAGTGCTCATCGCTTCCTCAACGTCGCATGSGGGGGATGCTCACAATGTTTATCA
GGGKAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGSAAACCATCTCTGGSGAGCACGGCCTCKA
CAGCAATGGKGTCTACAACGGKACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGTGTYT
ACTTCAACGAGGTATGCATTAACAGTCAATGTCAAGAATTCCCAAGCTCACACAACT
AGGCCTCTGGCAACAAGTATGTTCCCCGAGCCGTCCTCGTCGATCTTGAGCCTGGKA
CCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGT
TTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGAAACAACTGGGAAGGGGGCCAAAAAAAACCCAAGG
GGTCACTTAAGGGCCGCCGAAGACATTTATGATTTATGTACCGAGACAGACGCACA
CATATAGTGGTGGATTTTTGCACTGCCTCTTACCACCCTTCTACTTCGATCTTGTGAG
TCCGGGCGTCTGCTGCTACTGGGCTTAGAGAGCACTAACCTTGGGGTATGGAGGATT
GTGGAACTTCTGCACGCCCGGCGTGGGAAGCCCTCAGGTATTGTGGAGTCCCTATAG
TATTGGACCCAT

7 – B

Secuencias

>Aislado H2 – Gen ITS

CACGATCGTCCAGAATAGCGCTAAGAAGCTGTGCGTCAACTCAATTTATTTTTTTTCT
CTATGGCCACAACAAGCATCGATCCTTGCGGGGGCAGCGGGTGCCCTCTTGGGTCG
GGGTGGGTTCCCCTTGAAAAAATCTAGAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGA
TCATTACCGAGTTTACAACTCCCARACCCCTGTGAACATRCCACTTGTTGCCTCGGC
GGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTG
TTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCARAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG
GCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGKGTTGGGAC
TCRCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGYCACGTCGAGCTTCCATAGCGT
AGTAGTAAAACCCTCGTTACTGRTAATTCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCRRCT
TCTRAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAATTGATCA

>Aislado H2 – Gen β-tubulina

ATTTGGAAGAAGCAGGCCGCAGGGGCAGGAACCGGACTGGCTGCAAAAGAAGTTAT
CGGGGGGGCAGAGAGGCCAAAAAGGTCATGAAAGGACTGCGTCGAGGCCACCGGG
CTGTAAACGGGGAAGGGCGGTTAACATGCCGGAGATTGTAAGTAATTCCTTTAGCTC
TAGCTTCGAGCTGCTGTGCTCCTGCACGCGCTGAGCTTGTGCTTCGTGCCCCTGATTC
TACTGTACCCCGCTGGGCTTCGGCAGGTCAACAACAATGCACGATAGCTCGCAGCTT
GATCAATGACTTCCCCAGAATCAATACGCTAACCTTGTTCTTTTCTTTGCAATAGGTT
CACCTTCAGACCGGTCAGTGCGTAAGTACTTGTCTCTTCGACCCAGTCACCCAGTGA
TGCTAACAATGTTTATTAGGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGCAAACCATCTC
TGGCGAGCACGGTCTCGACAGCAATGGTGTTTACAACGGTACCTCCGAGCTCCAGCT
CGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACGAGGTTTGTTCTATCACTCCTACCACGAAAAC
ACAACAAGCTCACGCGCGCCTAGGCTTCCGGTAACAAGTATGTTCCCCGTGCCGTCC
TCGTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCGGACAGC
TTTTCCGTCCCGACAACTCGTTT

7 – C

Secuencias

>Aislado H3 – Gen ITS

TTACCGAGTTTACAACTCCCGACCCCTGTGAACATGCCACTTGTTGCCTCGGCGGAT
CAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCT
ATATGTAACTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCT
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAA
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGGGTTGGGACTCAC
GTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGCCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTA
GTAAAACCCTCGTTACTGATAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCGGCTTCTGA
ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAATTGATCA

> Aislado H3 – Gen β-tubulina

AGGTCTAGTCCCAGGGGGCCGCGATTGAAGTTGTGTATTGGAAGAGCTGGCGCAGG
TACGGTCCGGACGGCGTCCATAGACCGGTCTAGAGGTCGGAGAGACGCAATGTTAT
TGTACTTCTGGCTCGAGGCCTCGATGGATGTAGACGGTCAAGGGGGGGGGGGTTTTT
TGAAGGATCTTAAAAAAGGGGGGATTGTAAGTACCTCTCTTTTTAAGTTCGTGTTGT
GCTGTTGCACGCGTTGAGTTTATCATGCCCCTGATTCTACCCCGCTGGGCGGTGGCA
GCTCAACGACAATGCACGATAGCTACCAGCTTTACCATACCTTCTGTCAAGACAAGA
AGCTAATCAGATCTCTTCTCTACAATAGGTTCACCTCCAGACCGGTCAGTGCGTAAG
TGCTCATCGCTTCCTCAACGTCGCATGCGGGGGATGCTCACAATGTTTATCAGGGTA
ACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCA
ATGGTGTCTACAACGGTACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGTGTCTACTTCA
ACGAGGTATGCATTAACAGTCAATGTCAAGAATTCCCAAGCTCACACAACTAGGCCT
CTGGCAACAAGTATGTTCCCCGAGCCGTCCTCGTCGATCTTGAGCCTGGTACCATGG
ACGCCGTCCGTGCTGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGG
CCAGTCCGGTGCTGGAAACAACTGGGAAGGGGCTCAATAAAAGAACAGCGCACGCC
CGTCCGCCTGACCGTTGCATCCCGGTGCCCTGGACCCCGTCGTAACCAACCTTTCGG
CAGCTCTGCCGCCCCGACAACGTCTTTTTTACCCAGTCCGGTGCCGGTACCTGCGGC
CAGTTCTTCCATATATAAAACTTATATCGCGGTCTCTTGTGTCCGAGAAC

7 – D

Secuencias

>Aislado H7 – Gen ITS
ATCCGAGGTCNCCTTTGGAAAATTGGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCC
CAGTGCGAGACGTAAAGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTAC
CTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTG
AAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGCTTG
TACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCCTCCGGCGGGCGCCG
ACCCGCCCGGAGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCGCGGAGACCCTACCCGCCGAAGCA
ACAGTTATAGGTATGTTCACAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATGATCCCTC
CGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTA

>Aislado H7 – Gen β-tubulina
CAAACGCTTGCGACGCGTTTATCCGCCTCGCCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTTT
TACCCGACTTCCATGCTCAACAAACCCGCGACGCCTGTCAATCATCGACGTCCAACT
CTGGAATGTTTTGCTGACCT
GCTTTTCTGTCTACAGGTTCACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTCTTCCCAAGCC
AAATCCAACCGACTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGGTAACCAGATTGGTG
CTGCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACGACCC
GGCAATATATACTTGCGAGGACGGCAGATGTTGACGATAGAGTAGGCAAAACATTT
CTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGCCCCTTATCTGGCCAC
ATTGGTAGTTGACCGCTAAACTCGAACAGCTACAACG
GCACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACGAAGTTTGTTACC
TTATAGCCCCCAGAGTGCAAGATAAACATATTGACGAGTACTGACCTTCGCTCCTAC
CCAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTGCCCCGTGCCGT
CCTCGTCGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCGGCCA
GCTCTTCCGCCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTCTGGTGCCGGCAAC

7 – E

Secuencias

> Aislado H4 – Gen ITS, 39.5 % y 16.7 %

NNNNNNNNNNNNNTNTNNNCNTNNTCCGAGGTCACCAGAAAAAATTGGGGGTTTTA
CGGCCGGGGGGGCAGCACCTAACAGAAGCGAGATAAAAGATTACTACCCTCAGAG
GACCACTGCCACTCCGCCAATGTCTTTGAGGAACTACCAAGCCGTAGGTTCCCAACA
ATAAGCTGTGCTTAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGGATGCCCACTAGAATAC
TAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCCATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA
TTACTTATCCCATTTCCCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCGAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTTTGACTTATTAAATAAGACACTCAGATAATCAACTAAGATAACAAGAGTT
TTGGTTTGTCCGCCGGCGGGCCGCCCGGGGAGCGAGGTCCCGGGTAGCTTGCGTCN
AGGCAACAGATAGATAAGTTCACGTGGGTTTGGGAGTTGGATAACTCTGTAATGATC
CCTCCGCTGGTTCNCCAACGGAGACCTTGTTANNATNNTTANCNTNCANNANACCGG
GCNTNCCCGTGTCNACNGAATCGCNGNNGACACNCGCTGCNNCCNTCAGCCGAGTC
AATAGCTGGTNGTCGCNCANNCAGANANANAAAAAAANAGTGGNNTTGNGGANGC
GTANTTAGGCCGTGTGTCGGCNGATCGGTCAGCACCGTGCTNCNACACTTCNNATCG
TCGCANNNTATGCNGNCGNNGNGAGGANGA
NNGTNNNNNNGNNAGNNNNNGGANTTACNNAGTTATCCAACTCCCAAACCCATGTG
AACTTATCTCTTTGTTGCCTCGGAGCAAGCTACCCGGGACCTCCCGCCCCGGGAGGC
CCGCCGGCGGACAAACCAAAACTCTTGTTATCTTAGTTGATTATCTGAGTGTCTTATT
TAAGAAGTCGGAACTTTCTGCAACGGATCTCTTGGTTCTGGCTTCAATGAAGAACGG
CGCGATGTGCGTTAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCNAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTCCAGTGTTGAAAGTT
TTGACTTATTAAATTAATTGCTGGGAACCTACAGTTTCATAATTCCACATATGGTTTG
TCCGACGGGGGGTGGTCCTGTGAGCGTAGTAATCTTTTATCNCGCTTCTGTTAACAG
CTGCCCCCCTGGCCGTGGAACCGGGAGTTTTTTAAGTCTGACCTGAGACCTCGGCTG
AATACCCGCCGAACTTCTTGTTATCACTTTGCCCGACGAAANCCCACCCGGGTCNNC
CNGAAACGCTGNNGACACATGCTGCCTCTTTAACCGATCAAAGCCGGTCGTTCGATA
CACCACAAAAAAAAAAAAA

> Aislado H4 – β-tubulina 94.4 % y 76.3 %

NNNNNNNGNNNNNTCNCCNCGCGTCCTCGTTTTCCGCTGCCTATCTGCCGTCGTCGC
CGCCGTTGCATATCCTGGACGCGTCCCAAAGTCAAACTACGCCCCCCTGATTGCCTC
CCTCCTTGCCCCACCAGGCGCGCAGAGCGTTCTCGTCCGCGAAGACGACGACGACG
ACGACGACGACGACGACGGCAGCAGGAGCAGACATGATGACTATTACAAAACACC
GAGAAGCGCCTATGTACTGACTGTGGCTTCTTTGCGATATAGGTTCACCTCCAGACC
GGCCAGTGCGTAAGTAGCCACCCTTTACCCAAACCTCTCACGCCGAGCCCCGCTCGC
TCACATGTTTTATTACAGGGCAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGCAGCAGATTTCT
GGCGAGCACGGTCTCGACAGCGATGGCCAGTACGTTTCTCGCCTCCCGGTCCTCCTC
CTCTTCCCCTTCAGACCACGGTCGCGTCACGGCGGTGTAGAGAAAGAAAAAGAAGG
AACAAGAGACGATGCGATGGAAGCAAGAGAGCCGTCGGCTGACCATGCCCTCGCTA
CAGGTACAACGGCACCTCGGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACG
AGGCCTCGGGCAACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTCCTCGTCGATCTCGAGCCCGGTA

CCATGGACGCCGTCCGCGCCGGTCCCTTCGGCCAGCTCTTCCGCCCCGACAACTTCG
TTTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGCANCNNNGGCNNGGGGGGGGANAAAAAAAA
NNNNNNNNNNGNNCNANNGAAGTTGTCGGGGCGGAAGAGCTGGCCGAAGGGACCG
GCGCGGACGGCGTCCATGGTACCGGGCTCGAGATCGACGAGGACGGCACGGGGAA
CGTACTTGTTGCCCGAGGCCTCGTTGAAGTAGACGCTCATGCGCTCGAGCTGGAGCT
CCGAGGTGCCGTTGTACCTGTAGCGAGGGCATGGTCAGCCGACGGCTCTCTTGCTTC
CATCGCATCGTCTCTTGTTCCTTCTTTTTCTTTCTCTACACCGCCGTGACGCGACCGTG
GTCTGAAGGGGAAGAGGAGGAGGACCGGGAGGCGAGAAACGTACTGGCCATCGCT
GTCGAGACCGTGCTCGCCAGAAATCTGCTGCCAGAAAGCAGCACCGATTTGGTTGC
CCTGTAATAAAACATGTGAGCGAGCGGGGCTCGGCGTGAGAGGTTTGGGTAAAGGG
TGGCTACTTACGCACTGGCCGGTCTGGAGGTGAACCTATATCGCAAAGAAGCCACA
GTCAGTACATAGGCGCTTCTCGGTGTTTTGTAATAGTCATCATGTCTGCTCCTGCTGC
CGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCTTCGCGGACGAGAACGCTCTGCGCGC
CTGGTGGGGCAAGGAGGGAGGCAATCAGGGGGGCGTAGTTTGACTTTGGGACGCGT
CCAGGATATGCAACGGCGGCGACGACGGCAGATAGGCAGCGGAAAACGAGGACGC
GTGGGAGGAAGAGGGGCAGCAGTAGTCACTNNNNNNCCCCCCTNNNNTTTAAANNN
NNNNGNNGNNGNGNCNGNCTCGCCCCCCGCCCCCTTCCTTCCNNACCCTCCCGTGN
GGNGCGGGGCCNGTTTATTNGGTTTTATTGAGNGGGGCAAACATATNGGTGTTGTTT
NCTGGNAGCNGTTTTCNGGNGAGCTNGNNCTNGANNGCGATCGCNCNGNCNGTTTC
TNGCCTNCGGTCCTCNNNNTNNNTCTTAGGACCNNNTTGGCGTNNGNGGNNGNNCT
GANAGANAAAGTAGGCNANNATAG

7 – F

Secuencias

> Aislado H6 – Gen ITS, 12.1 % y 9.7 %

GGNNNNNNNNNNNNNNNNANTCANGTNCCTNCGTTTTCCGGGNTGGNTGGCGGCC
TGGAGGCTTTCCCNACACAGGGATTGGAGAGTGTGCCGCCGGAGGCGCCTTCCCTG
CCAGTCTATAAAAACAAGGGAGGGAACATAGAGTTGTTGCGCCAATTGTCCTTGGA
GGATGAAATGAGTTTCTCTGAGGGAGGCCCGCCAGAATAATGGCGGGCGCCCTGTG
TGTTCAAAGATTCTATGATTCCCNGACTTCTTTCTGGACCTTANAAANCGCATTTTGC
TGCTNTCTTTCCGGATGGCAGAACCGAAAGATCCGAGGTTGAATCTCTTGTTTTGTTT
TTTTGTTTTCCTCACAAATTCCATTGATATCGGAANTTCGGGGTCGTAGGGGGGGNC
GGGCCGTTTCCTTTTATAAAAANCAACCCCCAAGGGAACGTTTTTGTATGTTCCGTC
CACCTTGGGAGTTGAATTGTTGATAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGATCCC
GACANCTTTTTTTTTGGAATCGTCCCATACCTTTTTCCTCCCGTCACAACTAGAAACG
CAGAAGGCATCCTCCTGCTCTNAACCGATTAATGTTGTGTTGTTGATTTTCCTCNNNA
NANNNAANTAATGGGTTGGGGGGAGGGCGTCTNAGGCCTTCTCGGCACATCGTGTC
AGTCCCGTGCTCNACNACTTCNAATATTTAANAGATATTGNNGACGNNAGTGAGGA
GGANTN

NNNNGGNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGAANNAGGAGTTTCACTCCCAAAGGC
CTGTGAACATGCCTATACGTAGCCTCGGAGGAANGNCCGGACCCCGAAAAACGGGA
AGGCCCGCCCGAGGACCCCTAAAATTGGGTTACAGTGGAACTTCTGAGGAAACAAA
CAAATAAATCAAAACTTTCAAAAATGNAATCTCTTGGGGCTGGGCCCAATGAAAAA
CGCAGGGGCTGGGATAAGCAACGTGAACTGCAAAATTCAGAGTATCATCGATGCTT
TGTACTCTCATAGGGCCCGCCAGTCTTCTGGCGGGNAGGCCAGTTCGAGCGCCATTT
CAACCCCCTGCTCTTGTTGGGGTGGGGACCACCGGAAACCCGCGATCCACAGATTAT
TTGGAGGCGCGCGGGCCTTCCCTAGTTTATTGGTGAGCGANCACCTTACTAGGGATC
GCGGCGGCGACTGCACAACACACCGGGGGATGAATGCTCTGGACGGATCCCCCCGG
AATGCCCCACNAAATCAACCTTGTCTATCTTTGGAGGACACCGCNCCCCTACNTTGN
NACTTACGGTCACACNNANCNAAGGNGAGAGACGCTGCTCTTCAAGNGTAATGGTG
GTTGTGTCTAAACACAACTAAAAAAAAATNGTGGNTTGTGGACCCAGTATTTAATGC
CTTTTTCAGCGCANCGGGCCAGTGCGTGCTCCACTCTANACATATATCATATATATT
GCCGCGCGTGTGTGNAANACTAGGGCATATTATATNNCAACNGTAGCAG

> Aislado H6 – Gen β-tubulina 128 % y 16.1 %

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGTGCNNNACGCTTCCGCTGGGTTAGGGGCG
CCTGGTGGACTGCCTGGAAGAGGGCATAAGAGTGTGTCCCCGCCGTATACCGTTTCC
CTGCCAGTCTATAATAACAATTGGGGTTACAGAGTATGCTTTGCTCCCATTATNCTC
ACGGGGGATTTGNGNTTCTTTGGGGCAGGGATGGCTGAAGAACGGCGGGCGCTCCG
TGTGTTCATCTACTGTGCCACTTCTTTGGTTCCTTCTCATACCTACTCACGACCCTGG
GCCCCCTCCACTCCGGGGGGCCTGACCGAAAGCGCCGAGCTTCAGCCCCCTGGTTGT
GTTGTCTGTCGTGCCCCGAGATTCGCCGCGTATCTGAANTTCCGGTTCGGACGCGGC
GAGGTACAAGTCTTCCTCGANAGAAGAAAACACCCTCTGGGGGTCGGGTCTGNTGT
NCTACTCACCCCGGGCGCNGAATTGTGAGTNTNGATCNATNAGCTGNTAGCGNNCG
CNACCNCGACCNGTCTNNTNAGTGAATGCNCCCNTCATCNNGNATGCACNTGTCNC
ACGAATCGCAGGGTGATGTCNTGNTCTTCANCGANTACNAGTANGTNGTNGCTANC
NAGANNAAAAATANAATGAGATGNNCTGNGANGCGTAGTANGANTCTATGGACGC

NGACCGGATCTAGTACGTGCNNCACNACTCAGATAGATAGCTNANATGACGACGNT
GNGAGGAGACNGNGANNAGTNNNACTCAATNCN
NNNNNNNNNNTGNNNNNNNNNNNNNTNNNAGGCNNNCGTCCGTCTAGCGGGGGGTT
GTACCCCGACAGCCCCTCTTGATCCCAGGGCGAGACGTAAAGTTACCCCGCTCAGG
AGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGGATATGTCAGCTGTTGGGCCCCT
ACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA
TGCTGGGGNGCGCACTGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTC
ACATGACTTATCGAATTTCCCTGCGTTCTTCATGCGACCAAAACCAATGTTTCCGTTG
TTAAAGNTTTTGATTATTTGCTTGTACCACTCNGAANAAACTGCATTGAATCTGATGT
TGGTTATCCGCCGGCGTTGCGCCNACCCGNCCGGGGGCGGGAGGCCAGGAGGGTCA
CGGAGACCTTACCCGCCGAAGCCGAGTTATTGGTATGTTCACAATCCTTTGTAAAAC
GTAAACTCAGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTCAATCCAG
GTTTCCCGAAANCNGGCGTGCGGCAAGCCGTCCTCGCCGAGTTGGAGCCCGGTACC
ATGGACAGCCGTCGGAGCATAGTACTTTCTGCCAGCTCTTCCGTCTCGACAACTTCTT
TTTCGGCCAGTCTGGTGCCTGTACANTGNNNCTGGTGCCGGAAAAANGNNNNNN

Apéndice 8.
Secuencias de Referencias

8 – A

Secuencias referencias – H1

>HI NCBI REF

GGAAGTAAAATTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACC
GAGTTTACAACTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGC
CCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATAT
GTAACTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTTGGGACTCGCGTTA
ATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAA
AACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGT
GACCTCGGATCAGAGA

ATGCGTGAGATTGTAAGTACCTCTCTTTTTAAGTTCGTGTTGTGCTGTTGCACGCGTT
GAGTTTATCATGCCCCTGATTCTACCCCGCTGGGCGGTGGCAGCTCAACGACAATGC
ACGATAGCTACCAGCTTTACCATACCTTCTGTCAAGACAAGAAGCTAATCAGATCTC
TTCTCTACAATAGGTTCACCTCCAGACCGGTCAGTGCGTAAGTGCTCATCGCTTCCTC
AACGTCGCATGCGGGGGATGCTCACAATGTTTATCAGGGTAACCAAATCGGTGCTGC
TTTCTGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGTGTCTACAACGG
TACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGTGTCTACTTCAACGAGGTATGCATTAA
CAGTCAATGTCAAGAATTCCCAAGCTCACACAACTAGGCCTCTGGCAACAAGTATGT
TCCCCGAGCCGTCCTCGTCGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGG
TCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGA
AACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTGCCGAACTTGTCGACCAGGTCCT
CGACGTCGTCCGCCGTGAGGCCGAGGGCTGCGATTGCCTCCAGGGTTTCCAGATCAC
CCACTCTCTCGGTGGTGGTACCGGTGCCGGTATGGGTACTCTGCTCATCTCAAAGAT
CCGCGAGGAATTCCCCGACCGAATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAA
GGTCTCTGACACCGTCGTTGAGCCCTACAATGCCACCCTCTCCGTCCACCAGCTGGT
CGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGTATCGATAACGAGGCCCTCTACGATATCTGCAT
GCGCACCCTGAAGCTGTCCAACCCCTCCTACGGTGATCTCAACTACCTCGTTTCTGCT
GTCATGTCCGGCGTCACCACCTGTCTCCGTTTCCCCGGTCAGCTGAACTCCGACCTCC
GAAAGCTCGCCGTCAACATGGTGCCTTTCCCTCGTCTACACTTCTTCATGGTTGGCTT
TGCTCCTCTGACCAGCCGTGGTGCTCACTCTTTCCGCGCAGTCAGCGTTCCTGAGTTG
ACCCAACAGATGTTCGACCCCAAGAACATGATGGCTGCTTCGGACTTCCGCAACGGT
CGCTACCTGACCTGCTCGGCCATTTTGTGAGTGAACCCGATTTTGCACATAGAAATT
ATTTGCTAACTTTATACAGCCGTGGCCGTGTCGCTATGAAGGAGGTCGAGGACCAGA
TGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCTTCTTACTTCGTTGAATGGATTCCCAACAACA
TCCAAACAGCCCTTTGTGCCATCCCTCCCCGAGGACTTACGATGTCCTCGACCTTCAT
CGGAAACTCCACCTCTATCCAGGAGCTCTTCAAGCGTGTTGGTGAGCAGTTCACTGC
CATGTTCCGACGCAAGGCTTTCTTGCATTGGTATACTGGTGAGGGTATGGACGAGAT
GGAGTTCACTGAGGCCGAGTCTAACATGAATGATCTTGTCTCCGAATACCAGCAGTA
CCAGGATGCTGGTATTGATGAGGAGGAAGAGGAGTACGAGGAGGAGCTCCCTGAGG
GCGAGGAGTAA

8 – B

Secuencias de referencia – H2

> H2 NCBI REF KU872840.1| Fusarium oxysporum

CACTATGGCTCGTGAGGCGTCCGGACTGGCCCAGAGAGGTGGGCAACTACCACTCA
GGGCCGGAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
TCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCCT
GTGAACATACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACG
GCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAAACCATA
AATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA
GCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAAC
CCTCAAGCACAGCTTGGTGTTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTG
GCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTC
GCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCC
CTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTCGGGCC
CGAGTTGTAATTTGTAGAGGATACTTTTGATGCGGTGCCTTCCGAGTTCCCTGGAAC
GGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGATGCCAAATCTCTGTAAAGT
TCCTTCAACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTT
CTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCCGCACAAGGTAGAGTGATCGAAAG
CATGAAAAAGCACGTTTGAAAAGCAGAGCTTAAAAAGTACGTTGAAATTGTTTGAA
AGGAAGAGGAGCTTGTGGTGTGTAGTGAAAAAAAAAAATAATTCCTTTAGCTTGGC
TTTCGAGCTGCTGTGCTCCTGCACGCGCCGAGCTTGTGCTTCGTGCCCCTGATTCTAC
TGTACCCCGCTGGGCTTCGGCAGGTCAACAACAATGCACGATAGCTCGCAGCTTGAT
CAATGACTTCCCCAGAATCAATACGCTAACCTTGTTCTTTTCTTTGCAATAGGTTCAC
CTTCAGACCGGTCAGTGCGTAAGTACTTGTCTCTTCGACCTAGTCACCCAGTGATGC
TAACAATGTTTATTAGGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGCAAACCATCTCTGG
CGAGCACGGTCTCGACAGCAATGGTGTTTACAACGGTACCTCCGAGCTCCAGCTCGA
GCGTATGAGCGTCTACTTCAACGAGGTTTGTTTCATCACTCCTGCCACGAAAACTCA
ACAAGCTCACGCGCGCCTAGGCTTCCGGTAACAAGTATGTTCCCCGTGCCGTCCTCG
TCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCGGACAGCTTT
TCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGTCAATCCGGTGCCGGAAACAACTGGGCCAAGG
G

8 – C
Secuencia de referencia – H3

>H3 NCBI REF

CACTATGGCTCGTGAGGCGTCCGGACTGGCCCAGAGAGGTGGGCAACTACCACTCA
GGGCCGGAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
TCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCCT
GTGAACATACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACG
GCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAAACCATA
AATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA
GCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAAC
CCTCAAGCACAGCTTGGTGTTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTG
GCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTC
GCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCC
CTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTCGGGCC
CGAGTTGTAATTTGTAGAGGATACTTTTGATGCGGTGCCTTCCGAGTTCCCTGGAAC
GGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGATGCCAAATCTCTGTAAAGT
TCCTTCAACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTT
CTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCCGCACAAGGTAGAGTGATCGAAAG
CATGAAAAAGCACGTTTGAAAAGCAGAGCTTAAAAAGTACGTTGAAATTGTTTGAA
AGGAAGAGGAGCTTGTGGTGTGTAGTGAAAAAAAAAAATATGCGTGAGATTGTAAG
TACCTCTCTTTTTAAGTTCGTGTTGTGCTGTTGCACGCGTTGAGTTTATCATGCCCCT
GATTCTACCCCGCTGGGCGGTGGCAGCTCAACGACAATGCACGATAGCTACCAGCTT
TACCATACCTTCTGTCAAGACAAGAAGCTAATCAGATCTCTTCTCTACAATAGGTTC
ACCTCCAGACCGGTCAGTGCGTAAGTGCTCATCGCTTCCTCAACGTCGCATGCGGGG
GATGCTCACAATGTTTATCAGGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGCAAACCATC
TCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGTGTCTACAACGGTACCTCCGAGCTCCA
GCTCGAGCGCATGAGTGTCTACTTCAACGAGGTATGCATTAACAGTCAATGTCAAGA
ATTCCCAAGCTCACACAACTAGGCCTCTGGCAACAAGTATGTTCCCCGAGCCGTCCT
CGTCGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCCTTCGGTCAGCT
CTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGAAACAACTGGGCCAA
GGGTCACTACACTGAGGGTGCCGAACTTGTCGACCAGGTCCTCGACGTCGTCCGCCG
TGAGGCCGAGGGCTGCGATTGCCTCCAGGGTTTCCAGATCACCCACTCTCTCGGTGG
TGGTACCGGTGCCGGTATGGGTACTCTGCTCATCTCAAAGATCCGCGAGGAATTCCC
CGACCGAATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCTCTGACACCGT
CGTTGAGCCCTACAATGCCACCCTCTCCGTCCACCAGCTGGTCGAGAACTCCGACGA
GACCTTCTGTATCGATAACGAGGCCCTCTACGATATCTGCATGCGCACCCTGAAGCT
GTCCAACCCCTCCTACGGTGATCTCAACTACCTCGTTTCTGCTGTCATGTCCGGCGTC
ACCACCTGTCTCCGTTTCCCCGGTCAGCTGAACTCCGACCTCCGAAAGCTCGCCGTC
AACATGGTGCCTTTCCCTCGTCTACACTTCTTCATGGTTGGCTTTGCTCCTCTGACCA
GCCGTGGTGCTCACTCTTTCCGCGCAGTCAGCGTTCCTGAGTTGACCCAACAGATGT
TCGACCCCAAGAACATGATGGCTGCTTCGGACTTCCGCAACGGTCGCTACCTGACCT
GCTCGGCCATTTTGTGAGTGAACCCGATTTTGCACATAGAAATTATTTGCTAACTTTA
TACAGCCGTGGCCGTGTCGCTATGAAGGAGGTCGAGGACCAGATGCGCAACGTCCA

GAACAAGAACTCTTCTTACTTCGTTGAATGGATTCCCAACAACATCCAAACAGCCCT
TTGTGCCATCCCTCCCCGAGGACTTACGATGTCCTCGACCTTCATCGGAAACTCCAC
CTCTATCCAGGAGCTCTTCAAGCGTGTTGGTGAGCAGTTCACTGCCATGTTCCGACG
CAAGGCTTTCTTGCATTGGTATACTGGTGAGGGTATGGACGAGATGGAGTTCACTGA
GGCCGAGTCTAACATGAATGATCTTGTCTCCGAATACCAGCAGTACCAGGATGCTGG
TATTGATGAGGAGGAAGAGGAGTACGAGGAGGAGCTCCCTGAGGGCGAGGAGTAA

8 – D
Secuencia de referencia – H7

>H7 NCBI REF
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACT
GAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTA
GGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAG
GATAACCAAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAA
AACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTC
TGCTTGGTGTTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCT
CCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTC
TTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCC
GCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAACATGCGTGAGATTGTAAGTTGCA
GTCCATCACCTCAATCACAACAACGCTTGCGACGCGTTTATCCGCCTCGCCCCTGAG
CGTACCCCGCCGACATTTTTACCCGACTTCCATGCTCAACAAACCCGCGACGCCTGT
CAATCATCGACGTCCAACTCTGGAATGTTTTGCTGACCTGCTTTTCTGTCTACAGGTT
CACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTCTTCCCAAGCCAAATCCAACCGACTGATTG
CGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGGTAACCAGATTGGTGCTGCCTTCTGGTACGTGAC
GAGACCGCCGACGACCCGGCAATATATACTTGCGAGGACGGCAGATGTTGACGATA
GAGTAGGCAAAACATTTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGAGTGTATGTCA
TGCCCCTTATCTGGCCACATTGGTAGTTGACCGCTAAACTCGAACAGCTACAACGGC
ACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACGAAGTTTGTTACCTT
ATAGCCCCCAGAGTGCAAGATAAACATATTGACGAGTACTGACCTTCGCTCCTACCC
AGGCTTCCGGCAACAAGTACGTGCCCCGTGCCGTCCTCGTCGACTTGGAGCCCGGTA
CCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCGGCCAGCTCTTCCGCCCCGACAACTTCG
TCTTCGGCCAGTCTGGTGCCGGCAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT

Apéndice 9.
Análisis estadístico: Evaluación de la sensibilidad a AZ

9 – A

Hongo – *Colletotrichum alatae*

Análisis de la varianza

A

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
A	31	0.99	0.98	4.03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		66.79	7	9.54	272.90 <0.0001
Trat	66.79	7	9.54	272.90	<0.0001
Error	0.80	23	0.03		
Total	67.60	30			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.27916

Error: 0.0350 gl: 23

Trat	Medias	n	E.E.							
1	7.83	4	0.09	A						
6	5.58	4	0.09		B					
3	5.13	3	0.11			C				
5	4.53	4	0.09				D			
2	4.15	4	0.09					E		
7	3.75	4	0.09						F	
4	3.23	4	0.09							G
8	3.08	4	0.09							G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

B

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
B	32	0.99	0.98	3.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		66.42	7	9.49	276.86 <0.0001
Trat	66.42	7	9.49	276.86	<0.0001
Error	0.82	24	0.03		
Total	67.24	31			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.27017

Error: 0.0343 gl: 24

Trat	Medias	n	E.E.					
1	7.83	4	0.09	A				
6	5.40	4	0.09		B			
3	5.25	4	0.09		B			
2	4.45	4	0.09			C		
5	4.35	4	0.09			C		
7	3.58	4	0.09				D	
4	3.33	4	0.09				D	
8	3.05	4	0.09					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

9 – B

Hongo – *Colletotrichum gloesporioides*

Análisis de la varianza

A

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
A	32	0.98	0.97	2.65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31.20	7	4.46	144.53	<0.0001
Tratamientos	31.20	7	4.46	144.53	<0.0001
Error	0.74	24	0.03		
Total	31.94	31			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.25626

Error: 0.0308 gl: 24

Tratamientos	Medias	n	E.E.							
1	7.83	4	0.09	A						
2	7.55	4	0.09		B					
5	7.35	4	0.09		B	C				
6	7.20	4	0.09			C				
3	6.38	4	0.09				D			
7	6.15	4	0.09				D	E		
4	6.03	4	0.09					E		
8	4.63	4	0.09							F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

B

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
B	31	0.97	0.96	3.01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31.67	7	4.52	113.84	<0.0001
Tratamientos	31.67	7	4.52	113.84	<0.0001
Error	0.91	23	0.04		
Total	32.59	30			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.29764

Error: 0.0397 gl: 23

Tratamientos	Medias	n	E.E.					
1	7.88	4	0.10	A				
2	7.65	4	0.10	A	B			
6	7.43	3	0.12		B	C		
5	7.18	4	0.10			C		
3	6.30	4	0.10				D	
7	6.08	4	0.10				D	
4	6.08	4	0.10				D	
8	4.68	4	0.10					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)