

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y MOLECULAR  
DE ESPECIES DE *COLLETOTRICHUM* ASOCIADOS AL FOLLAJE DEL  
CULTIVO DE ÑAME (*DIOSCOREA* SPP.)**

Por

Stephanie E. Fuentes Aponte

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

2015

Aprobado por:

---

Merari Feliciano Rivera, Ph.D.  
Presidenta, Comité Graduado

---

Fecha

---

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

---

Fecha

---

Agenol González Vélez, M.S.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Elsie I. Parés Matos, Ph.D.  
Representante de Estudios Graduados

---

Fecha

---

Elvin Román Paoli, Ph.D.  
Director Interino de Departamento

---

Fecha

## ABSTRACT

Anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, is the most destructive disease in yam (*Dioscorea alata*) cultivation worldwide. The objective of this research is to identify morphologic, pathogenic and molecularly, species of *Colletotrichum* spp. associated with this crop on Puerto Rico. Germplasm collection and yam farms around the island were evaluated and a complete morphological characterization was performed. Pathogenicity tests were performed *in vitro* and molecular markers for ITS region, GAPDH and  $\beta$ -tubulin were used. Characterization of 22 isolates of *Colletotrichum* spp. was completed. The identified species were *C. gloeosporioides*, *C. ignotum*, *C. tropicale*, *C. aoteora*, *C. truncatum*, *C. alatae*, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. siamense* and *C. cliviae*. All of these isolates were pathogenic with wound, and in some cases without the wound on the tissue. This fungi were found pathogenic in *D. rotundata* and nine of the pathogenic species are new reports for this crop on the island.

## RESUMEN

La enfermedad más destructiva en el cultivo del ñame a nivel mundial es la antracnosis. El objetivo de esta investigación es el identificar morfológica, patogénica y molecularmente las especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a este cultivo en Puerto Rico. Se evaluó la colección de germoplasma de ñame y fincas alrededor de la isla y se realizó una caracterización morfológica completa. Las pruebas de patogenicidad se realizaron *in vitro* y molecularmente se utilizaron los genes de ITS, GAPDH y  $\beta$ -tubulina. Se completó la caracterización de 22 aislados de *Colletotrichum* spp. Las especies identificadas fueron *C. gloeosporioides*, *C. ignotum*, *C. tropicale*, *C. aoteora*, *C. truncatum*, *C. alatae*, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. siamense* y *C. cliviae*. Todas fueron patogénicas con herida, y algunos casos sin herida en el tejido. Este hongo fue patogénico en *D. rotundata* y se pudieron identificar diferentes especies de este hongo que son nuevos reportes para la isla.

A la persona que me enseñó a luchar por mis metas, a ser fuerte, responsable y dedicada.

Mi padre: **Ángel M. Fuentes**

A la mujer que le debo mi vida, que me ha dado su amor y apoyo incondicional en todas mis decisiones.

Mi madre: **Luz E. Aponte**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la vida por ponerme en el camino de estas maravillosas personas. Especialmente a mi consejera, Merari Feliciano por escogerme y poner toda su confianza en mí para ser su estudiante graduada. A los miembros de mi comité, la Dra. Lydia I. Rivera y a Agenol González, por todo el conocimiento brindado, su ayuda y apoyo durante toda la investigación. A Jesús Cardona por su apoyo incondicional en mis experimentos en la Estación Experimental Agrícola de Isabela y en los Catastros. A los proyecto Z-FIDA 22, C-520, H-94D y NIF-HSI Grant no. 2012-01871, por proveer los fondos para que esta investigación fuera posible. También quiero agradecer grandemente a los técnicos de laboratorio, Agros. Víctor M. González y Luis Collazo por siempre estar ahí para que se pudieran tener los materiales necesarios para los experimentos. A mis compañeros, especialmente a Cecilia Monclova por su amistad incondicional durante todos estos años, por los momentos de risa, por toda la ayuda, conocimientos compartidos y por ser la excelente persona que eres. A Jorge Caicedo, Luz Serrato, Lorena Simbaña, Casiani Soto, Yaniel Román, Yara Rosado y Heriberto Martínez por su colaboración y amistad durante estos años. Al personal de campo de la Estación Experimental Agrícola de Isabela y Corozal. Al Servicio de Extensión Agrícola por colaborar con los contactos de los agricultores, y a los agricultores por permitirnos el acceso a sus fincas y colaborar con la información. Finalmente, quiero agradecer especialmente a mi familia por siempre estar ahí, apoyarme en todo y por ser mi soporte en los momentos difíciles.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE APÉNDICES</b> .....	xvii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
Origen e importancia del cultivo de ñame .....	7
Producción y propagación.....	10
Plagas y Enfermedades.....	14
<i>Colletotrichum</i> spp. ....	19
Técnicas para la caracterización de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	21
Medidas de control .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Evaluación de la colección de germoplasma.....	26
Catastro en municipios de mayor producción de ñame.....	27
Caracterización morfológica de aislados.....	29
Pruebas de patogenicidad de aislados de <i>Colletotrichum</i> .....	32

Caracterización molecular de los aislados de <i>Colletotrichum</i> .....	35
<b>RESULTADOS</b>	
Evaluación de la colección de germoplasma.....	39
Catastro de enfermedades foliares en municipios de mayor producción de ñame.....	45
Descripción y caracterización de los aislados.....	55
Colección de germoplasma de ñame .....	55
Catastro de las fincas alrededor de la isla.....	55
Caracterización morfológica de aislados de <i>Colletotrichum</i> .....	60
Descripción fenotípica de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. en PDA.....	61
Descripción de Conidios y apresorios.....	61
Curvas de crecimiento .....	89
Pruebas de patogenicidad de aislados de <i>Colletotrichum</i> .....	94
Caracterización molecular de los aislados de <i>Colletotrichum</i> .....	100
<b>DISCUSIÓN</b> .....	107
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	114
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	116
<b>APÉNDICE A</b> .....	125
<b>APÉNDICE B</b> .....	152
<b>APÉNDICE C</b> .....	153
<b>APÉNDICE D</b> .....	163
<b>APÉNDICE E</b> .....	167

<b>APÉNDICE F</b> .....	169
<b>APÉNDICE G</b> .....	171
<b>APÉNDICE H</b> .....	188

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Producción anual de ñame en los diferentes países (Asiedu y Sartie, 2010).	2
<b>Figura 2.</b> Morfología del cultivo de ñame.	8
<b>Figura 3.</b> Tubérculos, de <i>D. rotundata</i> , cosechado en finca de Aibonito, P.R.	8
<b>Figura 4.</b> Producción de ñame en Puerto Rico desde los años 80 hasta el 2013.	11
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida de <i>Glomerella cingulata</i> y <i>Colletotrichum</i> sp. Tomado de Agrios (2005).	20
<b>Figura 6.</b> Colección de Germoplasma de ñame muestreada, ubicada en la Estación Experimental Agrícola de Corozal.	26
<b>Figura 7.</b> Seis pueblos en Puerto Rico de mayor producción de ñame a ser evaluados. Moca, San Sebastián, Aguada, Utuado, Barranquitas y San Lorenzo.	28
<b>Figura 8.</b> Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. mostrando los diferentes tipos de esporulación en medio de cultivo de agar de habichuelas tiernas. Se observó mayor esporulación en este medio (GBA).	31
<b>Figura 9.</b> Diagrama ilustrando los postulados de Koch utilizados para confirmar la patogenicidad de diferentes organismos.	34
<b>Figura 10.</b> Arreglo de pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> en tejido foliar. Tres replicas por cada tratamiento.	34
<b>Figura 11.</b> Síntomas evaluados en seis cultivares (cv.) de <i>Dioscorea alata</i> obtenidos de la colección de germoplasma de ñame. (A-C) cv. Binugas, (D-F) cv. Forastero, (G-I) cv. Diamantes, (J-L) cv. Del Monte, (M-P) cv. PI 15587 y (Q-S) cv. Purmay.	40
<b>Figura 12.</b> Síntomas evaluados en cuatro cultivares (cv.) de <i>Dioscorea alata</i> . (A-D) cv. Kabusach, (E-G) cv. Kinabayo, (H-J) cv. PI 15567 y (K-M) cv. Gunung.	41
<b>Figura 13.</b> Síntomas evaluados en el cultivar Mapuey de la especie <i>Dioscorea trifida</i> .	42
<b>Figura 14.</b> Síntomas evaluados en el cultivar PI 15520 de la especie <i>Dioscorea</i>	42

*cayenensis*.

- Figura 15.** Síntomas evaluados de tres cultivares de *Dioscorea rotundata*. (A-C) cv. Colombiano, (D-F) cv. Guinea negro y (G-I) cv. Geño. 43
- Figura 16.** Síntomas evaluados en ocho cultivares de *Dioscorea esculenta*. (A-D) cv. Beti, (E-G) cv. Kombi, (H-I) cv. Doli, (J-K) cv. Muni, (L-M) cv. PI 11346, (N-O) cv. PI 13345, (P-Q) cv. PI 13347 y (R-S) Seti. 44
- Figura 17.** Métodos de siembra en las diferentes fincas evaluadas alrededor de la isla. San Sebastián; (A-C). Moca; (D-E). Barranquitas; (F-H). Aguada; (I). San Lorenzo; (J-K). Utuado; (L-M). 46
- Figura 18.** Niveles de severidad en la sintomatología observada en las especies *Dioscorea alata* y *D. rotundata* en los diferentes pueblos visitados alrededor de la isla. 47
- Figura 19.** Síntomas observados en las fincas del pueblo de San Sebastián. (A) F21184, (B) F11241, (C) F11242, (D) F11243, (E) F11244, (F) F31241, (G) F31242 *Dioscorea rotundata* cv. Guinea, (H) F21181, (I) F21182, (J) F21183 *D. rotundata* cv. Guinea Negro, (K) F2122, (L) F2123, (M) F2121 *D. rotundata* cv. Colombiano y (N) F31241 *D. rotundata* cv. Guinea. 49
- Figura 20.** Síntomas observados en las fincas del pueblo de Moca. (A) F42241, (B) F42242, (C) F42243, (D) F42244 *Dioscorea rotundata* cv. Guinea, (E) F52251, (F) F52252, (G) F52253 y (H) F52254 *D. alata* cv. Florido. 50
- Figura 21.** Síntomas observados en las fincas de Barranquitas. (A) F85241, (B) F85242 *Dioscorea rotundata* cv. Guinea, (C) F65251, (D) F65252, (E) F65253 *D. alata* cv. Florido, (F) F7591 *D. trifida* cv. Mapuey, (G) F75241 *D. rotundata* cv. Guinea y (H) F75251 *D. alata* cv. Florido. 51
- Figura 22.** Síntomas observados en las fincas de Aguada. (A) F94241, (B) F94242, (C) F94243 *Dioscorea rotundata* cv. Guinea, (D) F94251, (E) F94252 y (F) F94253 *D. alata* cv. Florido. 52
- Figura 23.** Síntomas observados en la especie *Dioscorea rotundata* cv. Guinea en las fincas de San Lorenzo. (A) F106241, (B) F106242, (C) F106243, (D) F116241, (E) F116242, (F) F11621 y (G) F11622. 53
- Figura 24.** Síntomas observados en las fincas de Utuado. (A) F133251A *Dioscorea alata* cv. Florido, (B) F133241, (C) F123241, (D) F123242 y (E) F123243 *D. rotundata* cv. Guinea. 54

<b>Figura 25.</b>	Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtenidos de muestras foliares de <i>Dioscorea alata</i> de la Colección de Germoplasma ubicada en predios de la UPRM en Corozal, Puerto Rico.	57
<b>Figura 26.</b>	Géneros de hongos identificados de muestras foliares de <i>Dioscorea</i> spp. de la Colección de Germoplasma ubicada en predios de la UPRM en Corozal, Puerto Rico	57
<b>Figura 27.</b>	Géneros de hongos aislados de muestras foliares de <i>Dioscorea</i> spp. en el catastro realizado a través de la isla de Puerto Rico.	59
<b>Figura 28.</b>	<i>Colletotrichum alatae</i> (F52251A) aislado de <i>Dioscorea alata</i> cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, margen entero. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 $\mu$ m.	67
<b>Figura 29.</b>	<i>Colletotrichum alatae</i> (F52253A) aislado de <i>Dioscorea alata</i> cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, margen entero. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 $\mu$ m.	68
<b>Figura 30.</b>	<i>Colletotrichum alatae</i> (F133251A) aislado de <i>Dioscorea alata</i> cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, margen entero. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 $\mu$ m.	69
<b>Figura 31.</b>	<i>Colletotrichum aotearoa</i> (G81) aislado de <i>Dioscorea alata</i> cv. Diamantes. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, margen irregular. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 $\mu$ m.	70
<b>Figura 32.</b>	<i>Colletotrichum cliviae</i> (F85241C) aislado de <i>Dioscorea rotundata</i> cv. Guinea. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 $\mu$ m.	71
<b>Figura 33.</b>	<i>Colletotrichum cliviae</i> (G14B) aislado de <i>Dioscorea alata</i> cv. PI 15587. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 $\mu$ m.	72
<b>Figura 34.</b>	<i>Colletotrichum cliviae</i> (G61B) aislado de <i>Dioscorea alata</i> cv. Forastero. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 $\mu$ m.	73

- Figura 35.** *Colletotrichum fructicola* (G23B) aislado de *Dioscorea rotundata* cv. Colombiano. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m. 74
- Figura 36.** *Colletotrichum fructicola* (G62A) aislado de *Dioscorea alata* cv. Forastero. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m. 75
- Figura 37.** *Colletotrichum gloeosporioides* (F52252D) aislado de *Dioscorea alata* cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra = 10  $\mu$ m. 76
- Figura 38.** *Colletotrichum gloeosporioides* (G12B) aislado de *Dioscorea alata* cv. PI 15587. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m. 77
- Figura 39.** *Colletotrichum ignotum* (F11244B) aislado de *Dioscorea rotundata* cv. Guinea. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares o enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m. 78
- Figura 40.** *Colletotrichum karstii* (G122A) aislado de *Dioscorea esculenta* cv. Muni. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m. 79
- Figura 41.** *Colletotrichum siamense* (F11244A) aislado de *Dioscorea rotundata* cv. Guinea. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m. 80
- Figura 42.** *Colletotrichum siamense* (G42B) aislado de *Dioscorea alata* cv. Del Monte. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m. 81
- Figura 43.** *Colletotrichum siamense* (G12D) aislado de *Dioscorea alata* cv. PI 15587. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m. 82

- Figura 44.** *Colletotrichum theobromicola* (G121B) aislado de *Dioscorea esculenta* cv. Muni. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm. 83
- Figura 45.** *Colletotrichum tropicale* (G13A) aislado de *Dioscorea alata* cv. PI 15587. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio ovoides, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm. 84
- Figura 46.** *Colletotrichum tropicale* (G73D) aislado de *Dioscorea alata* cv. Gunung. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm. 85
- Figura 47.** *Colletotrichum tropicale* (G143A) aislado de *Dioscorea alata* cv. Purmay. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm. 86
- Figura 48.** *Colletotrichum tropicale* (G153A) aislado de *Dioscorea alata* cv. Kinabayo. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm. 87
- Figura 49.** *Colletotrichum truncatum* (F21182A) aislado de *Dioscorea rotundata* cv. Guinea Negro. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios fusiformes, alargados. Barra= 20 µm (B-C). (D) Setas estériles, barra=140 µm. 88
- Figura 50.** Curvas de crecimiento de *Colletotrichum tropicale* en PDA a 28°C ([A] G143A, [B] G13A, [C] G73D y [D] G153A), *C. gloeosporioides* ([E] F52252D y [F] G12B) y *C. fructicola* ([G] G23B y [H] G62A). 91
- Figura 51.** Curvas de crecimiento de *Colletotrichum siamense* en PDA a 28°C ([A] G12D, [B] F11244A y [C] G42B), *C. ignotum* ([D] F11244B), *C. theobromicola* ([E] G121B), *C. aoteora* ([F] G81), *C. karstii* ([G] G122A) y *C. truncatum* ([H] F21182A). 92
- Figura 52.** Curvas de crecimiento de *Colletotrichum alatae* en PDA a 28°C ([A] F52253A, [B] F52251A y [C] F133251A), *C. cliviae* ([D] G61B, [E] F85241C y [F] G14B). 93
- Figura 53.** Pruebas de patogenicidad realizadas en tejido foliar de *Dioscorea alata* que mostraron nivel 1 ( $\geq 20\%$ ) de severidad. [A] *Colletotrichum* 96

*tropicale* G73D; [B] *C. gloeosporioides* G12B; [C] *C. alatae* F133251A; [D] *C. siamense* G12D; [E] *C. aoteora* G81; [F] *C. cliviae* G61B.

- Figura 54.** Pruebas de patogenicidad realizadas en tejido foliar de *Dioscorea alata* y *D. rotundata* que mostraron nivel 2 (20-40%) de severidad. [A-B] *Colletotrichum siamense* G42B y F11244A; [C] *C. alatae* F52251A; [D-E] *C. cliviae* G14B y F85241C; [F-G] *C. tropicale* G13A y G153A; [H] *C. truncatum* F21182A; [I]. *C.ignotum* F11244B; [J] *C. gloeosporioides* F52252D. 97
- Figura 55.** Pruebas de patogenicidad realizadas en tejido foliar de *Dioscorea alata*, *D. esculenta* y *D. rotundata* que mostraron nivel 3 ( $\geq 40\%$ ) de severidad. [A] *Colletotrichum tropicale* G143A; [B] *C. theobromicola* G121B; [C-D] *C. fructicola* G62A y G23B; [E] *C. alatae* F52253A. 98
- Figura 56.** Pruebas de patogenicidad realizadas en tejido foliar de *Dioscorea esculenta* que mostró un nivel 0 (0%) de severidad. *Colletotrichum karstii* (G122A). 99
- Figura 57.** Árbol filogenético construido de las secuencias de la región ITS del ADNr obtenidas de *Colletotrichum* spp. aislados de *Dioscorea* spp. Secuencias obtenidas del GenBank (♦). Outgroup; *C. destructivum*. 104
- Figura 58.** Árbol filogenético construido de las secuencias del gen de  $\beta$ -tubulina obtenidas de *Colletotrichum* spp. aislados de *Dioscorea* spp. Secuencias obtenidas del GenBank (♦). Outgroup; *C. destructivum*. 105
- Figura 59.** Árbol filogenético construido de las secuencias del gen de GAPDH obtenidas de *Colletotrichum* spp. aislados de *Dioscorea* spp. Secuencias obtenidas del GenBank (♦). Outgroup; *C. destructivum* 106

## LISTA DE TABLAS

		Página
<b>Tabla 1.</b>	Escala establecida para determinar la severidad de los diferentes aislados de <i>Colletotrichum</i> spp.	33
<b>Tabla 2.</b>	Iniciadores específicos para amplificar las secuencias de las diferentes regiones genéticas.	36
<b>Tabla 3.</b>	Secuencias de <i>Colletotrichum</i> obtenidas del GenBank utilizadas como referencia para construir los arboles filogenéticos.	38
<b>Tabla 4.</b>	Cantidad total de aislados de hongos obtenidos de muestras foliares de <i>Dioscorea</i> spp. de la Colección de Germoplasma ubicada en predios de la UPRM en Corozal, Puerto Rico y el número de <i>Colletotrichum</i> spp. por especie de ñame.	56
<b>Tabla 5.</b>	Características de las bacterias aisladas de las muestras obtenidas de muestras foliares de <i>Dioscorea</i> spp. de la Colección de Germoplasma ubicada en predios de la UPRM en Corozal, Puerto Rico.	58
<b>Tabla 6.</b>	Cantidad total de aislados obtenidos de muestras foliares de <i>Dioscorea</i> spp. en catastro realizado a través de la isla de Puerto Rico, y el número de <i>Colletotrichum</i> spp. por especie de ñame.	59
<b>Tabla 7.</b>	Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtenidos de muestras foliares de <i>Dioscorea</i> spp. caracterizados morfológica, patogénica y molecularmente.	60
<b>Tabla 8.</b>	Clasificación de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. en diferentes grupos de acuerdo a sus características fenotípicas en medio de cultivo PDA luego de siete días de incubación a 28°C.	62
<b>Tabla 9.</b>	Características morfológicas de los conidios de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtenidos de muestras foliares de <i>Dioscorea</i> spp.	64
<b>Tabla 10.</b>	Características morfológicas de los apresorios de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtenidos de muestras foliares de <i>Dioscorea</i> spp.	65
<b>Tabla 11.</b>	Promedio del crecimiento (mm) entre los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtenidos de manchas foliares de <i>Dioscorea</i> spp.	90
<b>Tabla 12.</b>	Resultados de las pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> en los diferentes aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. en tejido foliar de <i>Dioscorea</i> spp.	95

<b>Tabla 13.</b>	Similaridad entre las secuencias de tres regiones genéticas (ITS, $\beta$ TUB y GAPDH) obtenidas de <i>Colletotrichum</i> spp. aislados de <i>Dioscorea</i> spp., con secuencias previamente reportadas en el GenBank.	102
------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

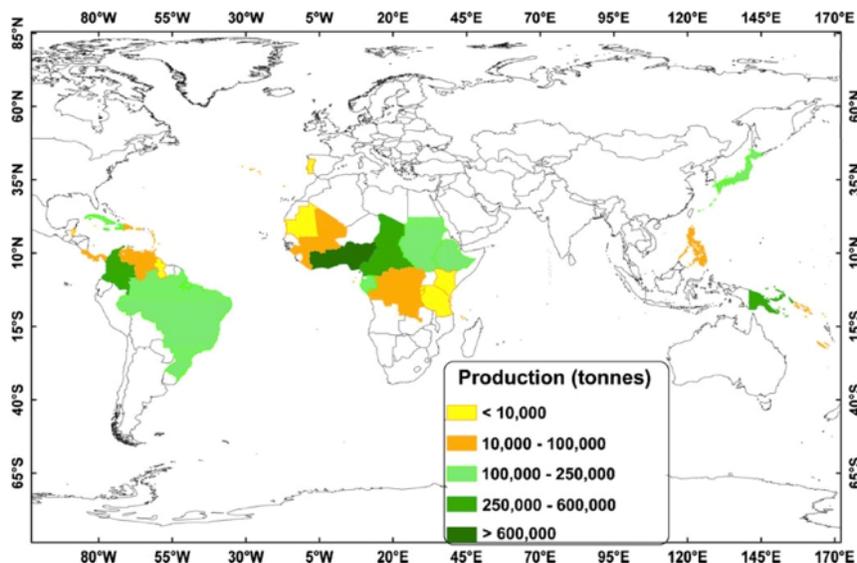
## LISTA DE APÉNDICES

	<b>Página</b>
<b>A-1.</b> Formularios del catastro realizado en las diferentes fincas alrededor de la isla.	126
<b>B-1.</b> Medio PDA (Agar de Papa Dextrosa)	153
<b>B-2.</b> Medio NA (Nutrient Agar)	153
<b>B-3.</b> Medio GBA (Agar de Habichuelas Tiernas)	153
<b>B-4.</b> Medio PDB (Caldo de Papa Dextrosa)	153
<b>C-1.</b> Códigos de aislados obtenidos dentro de la Colección	155
<b>C-2.</b> Códigos de los aislados obtenidos de las fincas.	160
<b>D-1.</b> Extracción de ADN	164
<b>D-2.</b> Purificación de ADN del producto de PCR.	165
<b>D-3.</b> Purificación de ADN de la gel.	166
<b>E-1.</b> Aislados con identificación morfológica	168
<b>F-1.</b> Análisis de varianza	170
<b>G-1.</b> Secuencias de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. con el gen de ITS de ADN ribosomal.	172
<b>G-2.</b> Secuencias de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. con el gen de $\beta$ -tubulina.	178
<b>G-3.</b> Secuencias de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. con el gen de GAPDH.	184
<b>H-1.</b> Números de accesoión de Secuencias de ITS.	189

## INTRODUCCIÓN

El ñame perteneciente a la familia *Dioscoreaceae*, género *Dioscorea*, es una enredadera anual que produce tubérculos o bulbos. Dicho cultivo de raíz o farináceo es uno de los más nutritivos y consumidos en países tropicales por ser una excelente fuente de carbohidratos, energía, vitamina C, minerales y proteínas (Wanansundera y Raindran, 1994; Asiedu y Sartie, 2010; Levot, 2008; Osunde, 2008; Raj et al., 2012). En África, es un cultivo de suma importancia por ser una gran fuente de ingresos y empleo (González-Vega, 2012). Alrededor de 60 millones de personas dependen de este cultivo como fuentes alimenticia en regiones tropicales (Asiedu y Sartie, 2010). África es el mayor productor de ñame a nivel mundial (Figura 1), produciendo un 93 por ciento del consumo mundial anualmente (FAOSTAT, 2013; Palaniyandi et al., 2011). Las especies más utilizadas para el mercadeo y el consumo a nivel mundial son *Dioscorea alata*, *D. cayenensis* y *D. rotundata* (Mignucci et al., 1988; Asiedu y Sartie, 2010; Egesi et al., 2009; Rodríguez, 2010). Entre estas tres especies, la más cultivada es *D. rotundata* ya que es tolerante a las enfermedades foliares y más apetecible al consumidor. Sin embargo, *D. alata* es más fácil de propagar y tiene mayor rendimiento en su producción, aunque el suelo tenga poca fertilidad (Egesi et al., 2009). Otras especies de este cultivo tienen importancia en la medicina tradicional (Asiedu y Sartie, 2010).

Entre los beneficios de este cultivo está la disponibilidad que tiene durante todo el año, por su amplia variedad de especies y cultivares. Éstas se pueden cultivar y cosechar en diferentes épocas, permitiendo tener el producto disponible durante todo el año.



**Figura 1.** Producción anual de ñame en los diferentes países (Asiedu y Sartie, 2010).

Otra de las ventajas es que tiene un tiempo de dormancia de 2 a 4 meses, lo que permite almacenarlo por largos periodos de tiempo sin refrigeración (Asiedu y Sartie, 2010; Rodríguez, 2000). Estas características lo hacen un cultivo importante en los periodos de escasez de comida.

Este cultivo perdura de seis a doce meses, dependiendo de la especie y variedad sembrada. En la propagación de este cultivo se utiliza el tubérculo o secciones de este y es mayormente sembrado en montículos (cerones) o bancos (González-Vélez, 2006). Para evitar la acumulación de humedad entre plantas y mejorar los rendimientos, los agricultores prefieren estacar las plantas (Asiedu y Sartie, 2010; González-Vélez, 1997).

El cultivo de ñame se ve afectado por un sinnúmero de enfermedades que afectan directamente el follaje y la semilla. En los cultivares de *D. rotundata*, la enfermedad principal es la pudrición de semilla causada por un complejo de patógenos que envuelve hongos, bacterias y nemátodos. En el cultivar Florido de *D. alata*, la enfermedad más destructiva es la antracnosis también conocida como “la candelilla” (González-Vélez, 1989). Esta enfermedad es causada por

el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y es la principal causa del decaimiento del cultivar Florido de *D. alata*, causando pérdidas en los rendimientos de un 50 a un 90% (González-Vélez, 2006; Egesi et al., 2007; Mignouna et al., 2001). En otros países, se han reportado especies de *Colletotrichum* provocando la antracnosis en otras especies de ñame, siendo *D. alata* la más susceptible (Amusa et al., 1996; Abang et al., 2002; Ayodele et al., 2003; Akem 1999; Onyeka et al., 2006). Este hongo es uno de los más importantes a nivel mundial causando enfermedades en una amplia gama de hospederos (Hyde, 2009). Es un hongo hemibiótrofo (Alleyne y O'Garro, 2008) filamentoso, cuya fase sexual se conoce como *Glomerella cingulata* (Weir et al., 2012; Hyde, 2009; Raj et al., 2012). El género comprende especies de epífitas, saprófitas y patógenas de plantas y humanos (Hyde et al., 2009). Una de las características de este hongo es la producción de estructuras especializadas llamadas apresorios. Estas estructuras son de suma importancia para que ocurra la enfermedad, ya que se utilizan para penetrar el tejido y obtener nutrientes de su hospedero (Deising et al., 2000). Los síntomas provocados por *Colletotrichum* spp. en este cultivo son necrosis foliar y muerte regresiva del tejido, reduciendo el área fotosintética, y por ende, el rendimiento de las plantas (Mignouna et al., 2001; Egesi et al., 2007). La antracnosis ataca este cultivo en todas las etapas de desarrollo, siendo la etapa de tuberización la más susceptible (Egesi et al., 2009; Rodríguez, 2000; Palaniyandi et al., 2011).

El establecimiento de medidas de control efectivas depende de una identificación precisa del patógeno. Usualmente, este hongo es identificado morfológicamente por las características de sus conidios y apresorios, curvas de crecimiento y apariencia en medio de cultivo, pero esto no es práctico debido a la similitud entre las diferentes especies (Hyde et al., 2009). Para una identificación efectiva y confiable de este hongo es necesario emplear técnicas moleculares (Onyeka et al., 2006; Mignouna et al., 2001; Ripoche et al., 2008). El gen más utilizado para

identificar hongos molecularmente es la región ITS de ADN ribosomal (Weir et al., 2012; Hyde et al., 2009). Sin embargo, esta región genética no separa bien las especies de *Colletotrichum*, por lo cual se recomienda la utilización de otros genes, esto en combinación con la caracterización morfológica. A pesar de esto, uno de los problemas en la caracterización molecular es que muchas de las secuencias existentes en los bancos de genes (“GenBank”) no se han identificado apropiadamente y se han limitado a *C. gloeosporioides* (Hyde et al., 2009). El diseño de marcadores moleculares específicos para ciertas regiones conservadas dentro del genoma es otro método recomendado (Raj et al., 2012).

Para controlar esta enfermedad hay que tener en cuenta que la intensidad de la enfermedad depende de la etapa fenológica del cultivo, en que estado este la epidemia, las temperaturas, la resistencia del cultivo y las prácticas culturales utilizadas (Egesi et al., 2009; Raj et al., 2012). El nivel de inóculo en el suelo y residuos de pasadas cosechas en los predios es otro factor conducente a que ocurra la enfermedad y continúe dispersándose (Raj et al., 2012). Entre las prácticas recomendadas en el control de esta enfermedad está el uso de variedades resistentes, material libre de enfermedades, y fungicidas (Asiedu y Sartie, 2010; Egesi et al., 2007). Sin embargo, los agricultores no poseen el conocimiento sobre la interacción de estos factores, ni poseen los recursos para la compra de productos químicos (Ripoche et al., 2008; Raj et al., 2012; Egesi et al., 2007). Por otro lado, el control químico requiere de aplicaciones bisemanales y mensuales, lo que no es favorable para el ambiente, e incurriendo en un alto riesgo de que el hongo desarrolle resistencia a los mismos (Onyeka et al., 2006; Palaniyandi et al., 2011). Es de suma importancia educar a los agricultores de fincas pequeñas sobre la importancia de utilizar prácticas culturales como la rotación de cultivos, ya que al tener poco terreno, estos no realizan

esta práctica. Esto aumenta la incidencia de la enfermedad por los residuos de plantas enfermas que contienen el inóculo y lo dispersan (Ripoche et al., 2008).

En Puerto Rico, la producción de ñame en los años 80 era de aproximadamente 16,000 toneladas, considerándose uno de los cultivos de raíz más importantes en la isla (González-Vélez, 1989). La producción ha mermado dramáticamente hasta las 8,749 toneladas para los años 2010-2011 (Departamento de Agricultura, 2011). Esta reducción se ha debido a factores económicos, plagas y enfermedades. Otro factor que abona a esta marcada reducción en la producción local ha sido la inhabilidad de los agricultores para competir con el producto importado, ya que éste es mucho más económico y la producción local no supe la demanda en la isla (González-Vélez, 2006). La importación de ñame a Puerto Rico proviene mayormente de Costa Rica, del cual se importan 15,120 toneladas anualmente, seguido de Colombia con 1,370 toneladas y Republica Dominicana y Nicaragua con 200 y 82 toneladas, respectivamente (Departamento de Agricultura, 2011). La única especie de *Colletotrichum* reportada en la isla y en otros países causando la antracnosis es *C. gloeosporioides*, siendo uno de los limitantes para el control de la enfermedad. El no identificar correctamente las especies, impide establecer métodos efectivos de control. Por otro lado, en los últimos 35 años no se ha realizado investigación de índole fitopatológica en este cultivo. Mucha de la investigación realizada en los años 80 estuvo enfocada en el rendimiento del cultivo en las cuales se realizaron evaluaciones generales de la antracnosis (Torres et al., 1986; Mignucci et al., 1988; Irizarry et al., 1993; Gonzalez-Velez, 2006; Gonzalez et al., 1989).

Como parte de los esfuerzos en incrementar la producción local de ñame en Puerto Rico, es necesario identificar y caracterizar patógenos foliares incluyendo las especies de *Colletotrichum* para desarrollar y establecer medidas de control específicas y efectivas que

incrementen la producción local y la competitividad de los agricultores con los productos de importación.

## REVISION DE LITERATURA

### Origen e importancia del cultivo de ñame

El ñame es un farináceo perteneciente al género *Dioscorea* (Asiedu y Sartie, 2010; Levot, 2008). La familia *Dioscoreaceae* está compuesta de nueve géneros y está representada por 600 a 900 especies de plantas, de las cuales 25 son de consumo humano (González-Vega, 2012; Egesi et al., 2009). Este cultivo es oriundo de las regiones tropicales de África, Asia y América (Lubin, 1990; Rodríguez, 2000). La planta se compone de tallos que forman bejucos con una alta capacidad para trepar y la forma de sus hojas varía de acuerdo a la especie y cultivar (Figura 2). El tubérculo, el cual es comestible (Figura 3), es un tallo engrosado producida en el subsuelo o aéreas en algunas especies (Rodríguez, 2000; Baquero, 2002). Las diferencias entre el ñame y el resto de las raíces y tubérculos radica en su amplia diversidad genética y origen. Las especies se han separado en *D. alata*, *D. rotundata*, *D. esculenta* y *D. trifida* (González-Vega, 2012).

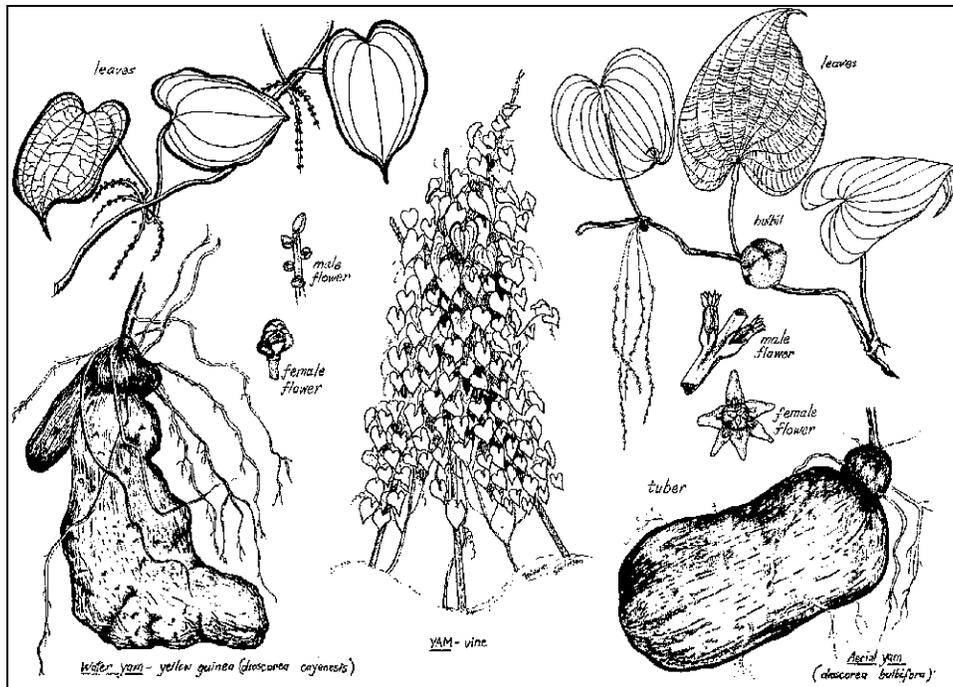


Figura 2. Morfología del cultivo de ñame. Tomado de nzdl.org.



Figura 3. Tubérculos de *D. rotundata*, cosechado en una finca de Aibonito, P.R.

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). Aunque la cantidad de proteína que contiene el ñame es más baja que la proteína presente en la mayoría de los cereales, éste puede proveer más proteína por hectárea por año que el maíz, arroz, sorgo y soya. Es por esto que se considera el segundo cultivo de raíz más importante en África, seguido de la yuca (Delebo, 2008; Raj et al., 2012). Además, proporciona alrededor de 300 calorías en la dieta diaria a las personas que lo consumen. Constituye una excelente fuente de carbohidratos, sales minerales como el calcio, el hierro y el fósforo, contiene altos niveles de 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 (Wanasundera y Ravindran, 1994). Presenta también bajos niveles de grasa, es buen estimulante del apetito y excelente depurador de la sangre (González-Vega, 2012). Estudios recientes sugieren la utilización de especies tales como *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, *D. dumetorum*, *D. trifida*, *D. laxifora* y *D. microbotrya* para prevenir la malaria, fiebre amarilla, el dengue y para incrementar la fertilidad en las mujeres (Siqueira, 2011).

Este género de plantas posee especies medicinales con alto contenido de diosgenina, la cual es utilizada en la síntesis de varios esteroides y es extraída de las raíces y el bulbo de esta planta (Ondo-Ovono et al., 2010). Especies silvestres como *D. opposita*, *D. villosa* y *D. batatas* contienen una progesterona natural que puede ser utilizada para tratar irregularidad menstrual, síndromes premenstruales y la menopausia. Además, otras especies reportadas como medicinales son *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, *D. dumetorum*, *D. trifida*, *D. laxifora* y *D. microbotrya* (Wu, 2005; Rebbeck et al., 2007).

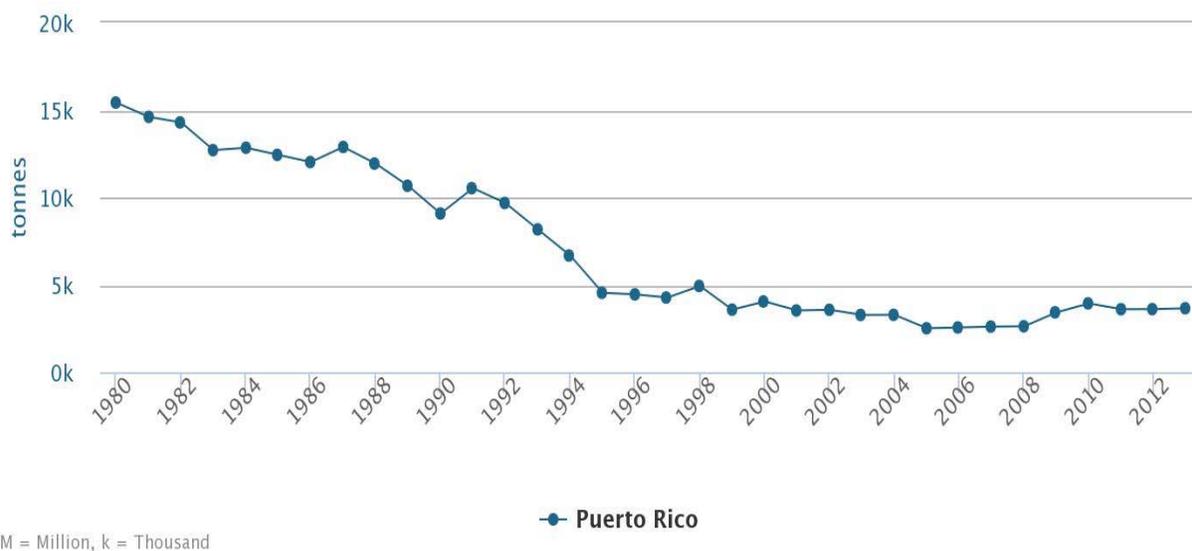
Otra de las razones por las cuales este cultivo uno de los más importantes son sus excelentes propiedades de almacenaje, ya que puede ser almacenado durante seis meses sin la necesidad de ser refrigerado (Ondo-Ovono et al., 2010). Este es cultivado por pequeños y medianos agricultores, es un cultivo flexible ya que por su amplia cantidad de especies y cultivares, puede ser sembrado durante diferentes épocas para tener el producto durante todo el año. Además, constituye la principal fuente de ingresos y empleo en muchas zonas rurales del mundo (Asiedu, 2003; González-Vega, 2012; Ruiz-Pérez, 2003).

## **Producción y propagación**

La producción mundial de ñame se estima en 63 millones de toneladas por año, de las cuales África produce aproximadamente el 97% (especialmente de la especie *D. rotundata*), siendo el mayor productor a nivel mundial (FAOSTAT, 2015; Asiedu et al., 2003; Asiedu y Sartie, 2010). A pesar de esto, la producción no da abasto con la demanda de este cultivo en este continente, estimándose que más de un 25% de la producción anual se pierde a causa de enfermedades y plagas (Amusa et al., 2003).

En P.R. en los años 80, el ñame era uno de los cultivos de raíz más importantes con una producción de aproximadamente 16,000 toneladas por año (FAOSTAT, 2015; González et al., 1989). Este ocupaba el tercer lugar de importancia en cultivos de farináceos en la isla (Departamento de Agricultura, 2011). Sin embargo, desde entonces la industria ha ido decayendo debido a diversos factores como las enfermedades, la economía, las plagas y la inhabilidad de los productores para competir con las importaciones de otros países (González-Vélez, 2006). En el año 2012, la producción estimada fue de 3,650 toneladas, con una reducción marcada de 12,350 toneladas (Figura 4) (FAOSTAT, 2015). Debido a esta dramática reducción, se importan grandes

cantidades de ñame de otros países, tales como Costa Rica y Colombia para abastecer el consumo local (González-Vélez, 2006; González et al., 1989; Departamento de Agricultura, 2011). La producción de ñame es relativamente costosa comparada con otros cultivos de raíces y tubérculos debido a los costos de producción, la mano de obra, rendimientos no favorables y pérdidas en su almacenaje (Asiedu y Sartie, 2010; Delebo, 2008). Los pueblos de mayor producción en la isla según el Censo Agrícola (2012) son Aguada, Barranquitas, Orocovis, San Lorenzo, San Sebastián, Yabucoa y Utuado.



**Figura 4.** Producción de ñame en Puerto Rico desde los años 1980 hasta el 2012 (FAOSTAT, 2015).

De las 600 especies de ñame existentes, sólo algunas son importantes a nivel alimenticio. En el oeste de África las especies más importantes son *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. alata*, *D. dumetorum*, *D. bulbifera* y *D. esculenta* (Delebo, 2008). Este cultivo se siembra en montículos o bancos con las plantas estacadas (González-Vélez, 1997). Una de las características de siembra en África es hacerlo en un nuevo predio luego de la cosecha para que los comerciantes puedan

tener el producto disponible luego de la cosecha regular. Asiedu (2010) menciona que las plantas estacadas tienen mayor producción que las otras, pero esto es un factor a evaluar con el costo de materiales y mano de obra del estacado. En investigaciones anteriores se predijo que debido a los costos de producción, mano de obra y pérdidas en el almacenaje, la producción del ñame podría reducirse dramáticamente en los próximos 15 años. La escasez del material de siembra en este cultivo y de terreno para la siembra del mismo son algunos de los contratiempos que tiene su producción (Opara, 2003).

En Puerto Rico, las especies más cultivadas son *D. rotundata* (cv. Habanero y Guinea Negro) seguido por *D. alata* (cv. Diamantes, Binugas y Kinabayo) y una pequeña cantidad de *D. trifida* (cv. Mapuey) (Mignucci et al., 1988; Hepperly and Vázquez., 1989). Este cultivo puede ser sembrado de diferentes formas de acuerdo a la especie que se desee cultivar. Requiere de suelos fértiles, sueltos, profundos y con buen drenaje (Rodríguez, 2000). En Puerto Rico el pH del suelo debe estar entre 5.5 y 6.5, y mayormente se siembra a una elevación de 200 metros sobre el nivel del mar, pero puede llegar hasta unos 600 metros (Román et al., 1991; Mignucci et al. 1988; González-Vélez, 2006). El riego puede ser natural o entre 152 y 203 centímetros de lluvia bien distribuidas durante el ciclo de crecimiento (Hepperly and Vázquez, 1989; Román et al., 1991). Como material de propagación se utilizan rizomas enteros de 113 a 340 gramos ya que germinan mejor y resisten mejor la sequía y el ataque de plagas, también se utilizan secciones de rizomas de 113 a 227 gramos. Estos se deben cubrir con cal y secar al aire de 24 a 48 horas antes de sembrar para suberizar el tejido y evitar la pudrición (Mignucci et al., 1988; Mozie, 1984). La duración del período de latencia natural fluctúa entre 4 y 18 semanas dependiendo de la variedad de ñame. Se han utilizado algunos compuestos químicos para prolongar el periodo de latencia, y por ende, el período de almacenaje y mercadeo (Ruiz-Pérez,

2003; Delebo, 2008). Un ejemplo de esto es el ácido giberélico, que aplicado a los tubérculos después de su cosecha, ha sido capaz de extender el período de latencia por nueve hasta once semanas en *D. rotundata* y por 13 semanas en *D. alata* (Rao, 1990; Girardin et al. 1997). Durante el período de almacenaje se pierden grandes cantidades de ñame por diversas causas. Algunas de estas pérdidas son endógenas, fisiológicas e incluyen la transpiración, respiración y germinación del ñame, otras son factores exógenos, tales como insectos, nemátodos, ratas, bacterias y hongos que deterioran el producto almacenado (Delebo, 2008; Girardin et al., 1997).

En la preparación del suelo se utilizan dos cortes o más de arado y rastrillado según sea necesario, esto para facilitar la preparación de los bancos y cerones. Se debe preparar bien el suelo para evitar que se afecte la forma y apariencia del ñame, y que no dificulte la cosecha (González et al., 1997; González-Vélez, 2006). La época y distancias de siembra varían entre las especies. La especie *D. rotundata* se puede sembrar desde enero a mayo dependiendo de la zona, pero se recomienda sembrarlo de octubre a diciembre para cosecharlo en la época cuando no hay producción de ñame local (Ramírez, 1984). La semilla de este se debe sembrar sobre el banco a 0.08 metros de profundidad cubriendo la misma, se pueden sembrar a 1.2 m de separación entre bancos y de 0.30 m a 0.46 m entre plantas. Es necesario estacar las variedades de esta especie de ñame (González et al. 1997; Román et al., 1984). En *D. alata* la época de siembra es entre abril y mayo, y la distancia de siembra es de 0.91 m a 1.2 m entre los bancos y 0.30 metros entre plantas (González-Vélez, 2006). Aunque las variedades dentro de esta especie no requieren estacado, se recomienda realizarlo ya que mantienen las hojas expuestas a la luz solar, aumentando el proceso fotosintético y reduciendo la exposición al suelo. Esta práctica incrementa los rendimientos y evita el contacto de ésta con el inóculo de microorganismos patógenos en el suelo (González et al., 1997). Algunos agricultores de la isla utilizan un método

de siembra llamado cerones, en el cual preparan montículos de tierra de aproximadamente 0.91 m, en cada uno de los montículos se siembran de 3 a 4 semillas y se les coloca una estaca de 1.52 a 2.13 m para que las plantas se enreden (Cardona, 2007).

## **Plagas y Enfermedades**

El cultivo de ñame es afectado por un sinnúmero de plagas y enfermedades, tanto foliares como en el tubérculo. Entre los patógenos que causan enfermedades en el follaje esta *Curvularia* spp. provocando manchas circulares necróticas, y *Fusarium oxysporum*, *Cescospora* sp. y *Sclerotium rolfsii*, causando marchitez vascular (Mignucci et al., 1988; Amusa et al., 1996; Twumasi, 1986). En Puerto Rico se demostró una interacción entre *Fusarium* sp., *Meloidogyne incognita* y *Pratylenchus coffeae* afectando la semilla y tallos en *D. rotundata* (Montalvo y Meléndez, 1986). En India, Hong Kong y Guadalupe también se ha reportado *Curvularia eragrostides*, causando manchas en el follaje de este cultivo (Torres-López et al., 1986). En Puerto Rico desde los años 1980 se ha reportado una alta incidencia de *Curvularia* spp. mayormente en *Dioscorea rotundata* cv. Guinea y *Dioscorea alata* cv. Florido, Binugas, Forastero y Purmay. Este hongo causa manchas necróticas redondas en el follaje con márgenes irregulares y algunas de estas con los márgenes cloróticos (González et al., 1997; Torres-López et al., 1986). En estudios previos se identificaron dos especies de este hongo, *Curvularia eragrostides* y *Curvularia geniculata* causando este tipo de lesiones, pero sin embargo, los síntomas aparecían más rápido y más severos con *C. eragrostides* (Torres-López et al., 1986). *Curvularia pallescens* es otra especie que se ha reportado afectando este cultivo en Nigeria (Amusa et al., 2003; Amusa et al., 1996), pero esta no ha sido reportada en Puerto Rico. *Dioscorea cayennensis* es otra especie de ñame afectada por este hongo en Brasil (De Paula,

2000). En el caso de *Fusarium oxysporum*, la enfermedad 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 (González et al., 1997; Pinzón et al., 2013). En los años 1980 en Puerto Rico, ésta fue una de las enfermedades más importantes en este cultivo.

En Nigeria se han reportado pérdidas en este cultivo a causa de las manchas necróticas causadas por el hongo *Cercospora* sp. (Emua y Fajola, 1983). Las lesiones son circulares, negras y brillosas en las hojas y tallos del ñame de agua (*D. alata*) (Twumasi, 1986). También se ha reportado en *D. alata* al hongo *Sclerotium rolfsii* causando lesiones negras, circulares y concéntricas en el follaje. Una vez la enfermedad avanza, las manchas en las hojas se secan y el tejido colapsa (Jeeva et al., 2005). En el sur de Nigeria este hongo se ha reportado como el segundo más comúnmente encontrado en lesiones foliares (Amusa et al., 2003). Sin embargo, en Puerto Rico no ha sido reportado en los últimos 30 años.

Las enfermedades causadas por virus también son limitantes en este cultivo. De todos los virus que afectan las especies de *Dioscorea*, se han identificado siete en Nigeria. Estos son: el Yam Mosaic Virus (YMV), *Dioscorea alata* virus (DAV), *Dioscorea dumetorum* virus (DdV), *Dioscorea alata* baciliform virus (DaBV), *Cucumber mosaic* virus (CMV) y *Dioscorea mottle* virus (DMoV) (Amusa et al., 2003, Asiedu et al., 2003). Los primeros tres antes mencionados son del género Potyvirus, DaVB es del género Badnavirus, CMV del género Cucumovirus y DMoV del género Comovirus (Asiedu et al., 2003; Kenyon et al., 2008). El YMV es transmitido por un áfido e infecta un sinnúmero de especies de *Dioscorea*, particularmente *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis* y *D. trifida*. Este virus es considerado el más importante en este cultivo, causando grandes pérdidas de hasta un 50% en regiones de África (Egesi et al., 2007).

Sus síntomas son manchas verdes, moteado, venas cloróticas y rizado en las hojas (Mignouna et al., 2003). El virus del ñame de agua o DAV es encontrado mayormente en esta especie y sus síntomas son muy similares al YMV (Amusa et al., 2003). En Puerto Rico se ha reportado que *D. trifida* y *D. esculenta* son más susceptibles al YMV (Hepperly y Vázquez, 1989; Gonzalez-Velez, 2011).

Debido a enfermedades post-cosecha, el ñame está sujeto a pérdidas que se estiman en un 50% en sus rendimientos. Entre los patógenos y plagas que afectan este cultivo post-cosecha en Puerto Rico están los nematodos: *Pratylenchus coffeae*, *Scutellonema bradys*, *Rotylenchus* sp. y *Meloidogyne incognita*; y el gusano blanco, *Diaprepes* spp. (Asiedu y Sartie, 2010; González et al. 1997, Román et al., 1984, Montalvo y Meléndez, 1986, Opara, 2003). En Nigeria se han reportado diferentes especies de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Botryodiplodia theobromae*, *Aspergillus tamari*, *Rhizopus nigricans*, *Sclerotium rolfsii*, *Muccor circinelloides*, *Trichoderma viridae* y la bacteria *Erwinia carotovora* asociados a daños en almacenaje (Amusa et al., 2003).

La pudrición seca, la pudrición blanda y la pudrición húmeda son tres de los daños causados por estos microorganismos en almacenaje. En la pudrición seca los síntomas varían en la coloración dependiendo del patógeno que está invadiendo los tejidos. Estos se tornan duros y secos y son invadidos por otros hongos saprófitos tales como *Aspergillus* sp., *Rosellinia bunodes*, *Botryodiplodia theobromae* 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 Nigeria, produciendo una coloración de rosa a amarilla en los bordes del tejido, dentro de estas especies se encuentran *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. moniliforme* (Amusa et al., 2003). Además, los nematodos, *S. bradys*

y *P. coffeae* causan pudrición seca del ñame, en su estado interno provocan lesiones crema y amarillas que pueden extenderse hasta la base del tallo y crear grietas sobre la corteza (Román et al., 1984). Estos nematodos desprenden la corteza y necrotizan la pulpa del ñame (González et al., 1997), como también atacan el tejido cortical del tubérculo, produciendo lesiones secas negras que reducen el desarrollo, la calidad, los rendimientos y por ende su valor comercial (Oramas et al., 1990). En el caso de la pudrición blanda, el tejido se torna marrón y blando debido a la producción de micelio de los hongos, y en algunas ocasiones se torna húmedo por el colapso de las paredes celulares. En Nigeria se ha reportado la presencia de los hongos *Rhizopus* spp., *Mucor circinelloides*, *S. rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Armillariella mellea* asociados a este tipo de pudrición (Amusa et al., 2003). La pudrición húmeda se caracteriza por la supuración de un líquido blanco fuera del tubérculo cuando éste es presionado; este síntoma usualmente está asociado a la bacteria *Erwinia catovora* (Okigbo, 2003).

A nivel mundial, la enfermedad más importante afectando el follaje del ñame es la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Abang et al., 2003; González-Vélez, 1989; Mignucci et al., 1988; Egesi et al., 2007; Ripoché et al., 2008). Sin embargo, en otros países se han reportado otras especies de este hongo causando daños en el cultivo (Amusa et al., 1996, Akem, 1999, Abang et al., 2003 y Abang et al., 2002). Esta enfermedad afecta las hojas, los peciolo y los tallos de las plantas, resultando en una necrosis extensa y muerte regresiva del tejido (Mignucci et al., 1988; Egesi et al., 2009; Abang et al., 2009). La especie de ñame más susceptible a este hongo es *D. alata* (Abang et al., 2006; Asiedu et al., 2010). En Nigeria este hongo se reporta afectando también la especie *D. rotundata* y *D. cayenensis* con la misma intensidad. Además, estudios previos en este país indican que esta enfermedad es causada por un conjunto de patógenos que incluyen: *Curvularia eragrostides*, *C. pallescens*,

*Colletotrichum gloeosporioides*, *R. solani* y *Pestalotia* sp. (Amusa et al., 2003). En varias investigaciones se ha podido demostrar que *C. gloeosporioides* produce diferentes patrones de crecimiento, colores del micelio y otras características morfológicas en medio de cultivo (Ayodele et al., 2003, Abang et al., 2005, Abang et al., 2006; Weir et al., 2012). En estudios realizados por el IITA (International Institute of Tropical Agriculture) en África se ha logrado aislar a *Colletotrichum truncatum* causando daño en el follaje de este cultivo (Ayodele et al., 2003). En un estudio para determinar los agentes causales de manchas foliares en ñame en Nigeria se encontró que *Colletotrichum graminicola* y *C. lindemuthianum* causan este tipo de lesión en las especies *D. alata* y *D. rotundata*, aunque estos no se aislaron con la misma frecuencia que *C. gloeosporioides* y *Curvularia eragrostides*, ambos resultaron patogénicos (Amusa et al., 1996).

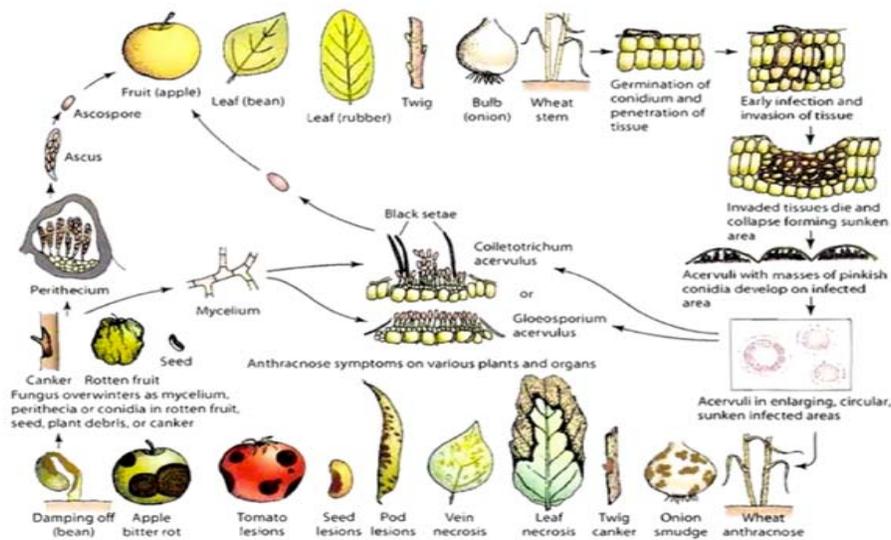
En Puerto Rico esta enfermedad afecta mayormente el follaje de *D. alata* cv. Florido reduciendo sus rendimientos en un 50% a un 90% (Mignucci et al., 1988, González-Vélez, 2006). Siempre se ha establecido que *C. gloeosporioides* es el único agente causal, a pesar de que en otros países se han reportado otras especies de este hongo afectando el cultivo. Localmente, las investigaciones anteriores han reportado que *D. rotundata* es tolerante a esta enfermedad (Cardona, 2007, González-Vélez, 2006), lo que ha llevado a los agricultores locales a sembrar esta especie sobre *D. alata*. Al contrario, en Nigeria se ha reportado que este hongo ataca ambas especies con la misma intensidad (Amusa et al., 1996, Amusa et al., 2003, Akem, 1999).

## ***Colletotrichum* spp.**

*Colletotrichum* spp. pertenece al Reino: Fungi, Filum: Ascomycota, Subfilum: Pezizomycotina, Clase: Sordariomycetes, Orden: Phyllachorales, Familia: Glomerellaceae y Género: *Colletotrichum* sp. (Agrios, 2005). Es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial causando grandes pérdidas económicas en un sinnúmero de cultivos. Además, contiene especies patógenas a humanos (Hyde et al., 2009). Durante su fase asexual desarrolla un acérvulo, que en algunas especies está rodeado de setas estériles. Esta característica se utiliza para diferenciar entre especies. Los conidios son ovaladas, hialinas y unicelulares. Su fase sexual, *Glomerella cingulata*, se desarrolla mediante la formación de un peritecio (Figura 5) conteniendo ascas y ascosporas (Baquero, 2002).

En medio de cultivo, este hongo presenta un crecimiento con micelio septado filamentoso y ramificado que se puede observar de colores blanco, gris oscuro, gris claro y/o verde oliváceo, dependiendo de la especie (Weir et al., 2012). Produce microesclerocios y masas de conidios que van desde color naranja a color salmón, característica distintiva de este hongo (Baquero, 2002). También produce apresorios, que son estructuras especializadas utilizadas para penetrar la célula de su hospedero y así obtener sus nutrientes. Estos se desarrollan de tubos germinativos que se forman cuando la conidia se adhiere a la superficie y germina (Weir et al., 2012). Entre los factores que permiten la formación de esta estructura están un sinnúmero de genes asociados a la infección y componentes en la superficie de la planta (Deising et al., 2000; Bailey et al., 1992). Para que pueda ocurrir la penetración directa tiene que aumentar la presión de turgor acoplado con degradación enzimática. Los apresorios maduros forman una hifa de penetración en la base de la célula, forman nuevas capas en su pared y secretan materiales extracelulares. A pesar de que este hongo comúnmente produce apresorios para poder penetrar la cutícula de su hospedero

formando un área punzante (Pegs) en el poro de penetración, éste también puede penetrar indirectamente a través de las estomas o aperturas del tejido sin la necesidad de tener esta estructura (Agrios, 2005). *Colletotrichum* utiliza diferentes tipos de infección. La mayoría de sus especies comienza la infección con la producción de una hifa primaria en una fase de biótrofo que puede durar de 24 horas a 3 días. Esta fase de biótrofo, el hongo la utiliza cada vez que va a infectar una nueva célula.. Una vez el hongo infecta la célula del hospedero, luego de 24 horas esta comienza a morir debido a la pérdida de las funciones de su membrana plasmática. Es aquí donde comienza la fase de necrótrofo donde éste se ramifica dentro de su hospedero por medio de una hifa secundaria y se alimenta de las células muertas (O'conell et al., 2000). Cuando los síntomas de la antracnosis comienzan a hacerse visibles ya el hongo ha avanzado rápidamente matando las células y no es hasta este punto que el hospedero comienza a activar las defensas de la planta. Sin embargo, esto no impide que el hongo continúe creciendo, ya que las células del hospedero que producen los compuestos inhibidores del crecimiento del patógeno, han sido destruídas (Agrios, 2005).



**Figura 5.** El ciclo de vida de *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum* sp.; Tomado de Agrios (2005).

## **Técnicas para la caracterización de *Colletotrichum* sp.**

### **-Caracterización Morfológica**

La caracterización morfológica se basa en las formas de crecimiento del hongo en medio de cultivo; color del micelio, desarrollo de la colonia mediante curvas de crecimiento y estructuras de reproducción o sobrevivencia (Rojas et al., 2010; Tous-Villareal, 2008). Las formas y tamaños de los conidios y apesorios es otro dato sumamente importante para diferenciar entre especies (Baquero, 2002). Sin embargo, la caracterización morfológica no es suficiente para identificar las especies, ya que éstas son muy parecidas entre ellas (Hyde et al., 2009). Es por esto que para una caracterización más efectiva y confiable es necesario emplear técnicas moleculares utilizando diferentes genes (Abang et al., 2002).

### **-Caracterización Molecular**

Las técnicas moleculares son esenciales para la identificación en hongos, mayormente para diferenciar entre especies de *Colletotrichum*. El reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) utilizando “primers” específicos, los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), son las técnicas más comunes para separar las especies de este hongo (Abang et al., 2005; Mignouna et al., 2003). La región de ITS (“Internal Transcribe Spacer”) de ADN ribosomal es la más utilizada para la identificación de este hongo (Cai et al., 2009). Sin embargo, en estudios recientes se han reportado la ineficiencia de este gen para separar bien las especies dentro del complejo de *C. gloeosporioides*, y se recomienda utilizar otros genes para una identificación más efectiva (Weir et al., 2012). Los genes de  $\beta$ -tubulina (BTUB) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) han mostrado ser efectivos en la identificación

de este hongo. La  $\beta$ -tubulina es una proteína que juega un rol importante en la formación del citoesqueleto y flagelos de los eucariotas, ya que es el componente esencial de los microtúbulos (Einax & Voight, 2003; Rojas et al., 2010). Por otro lado, la enzima GAPDH es sumamente importante en glucólisis, y en la patogenicidad de hongos y bacterias (Lima et al., 2009). Además de las dificultades utilizando la región de ITS, el mayor problema radica en el momento de analizar las secuencias en BLAST en el GenBank, ya que hay secuencias identificadas erróneamente. En estudios previos donde se analizaron las secuencias en el GenBank de *C. gloeosporioides* utilizando la región ITS del ADNr, se determinó que el 86% de éstas contenían divergencia y podrían ser otras especies del hongo (Cai et al., 2009).

#### **-Caracterización patogénica**

Para poder determinar que un hongo es patogénico a un cultivo, es de suma importancia realizar pruebas de patogenicidad que confirmen que el hongo aislado es el que realmente está causando la enfermedad (Riley et al., 2002). Esta técnica también se utiliza para caracterizar las diferentes especies de un mismo hongo debido al tipo de lesión que ocasiona. En el caso de las especies de *Colletotrichum*, éste también es identificado de acuerdo a las características de la lesión que se provoca en el tejido de las plantas (Ayodele et al., 2003). Sin embargo, esto también depende de la resistencia de las plantas que se estén evaluando. Entre las características que se evalúan está el color de la lesión, la forma de ésta, el tiempo de aparición de la lesión y cuan severa resultó (Baquero, 2002). Además, se evalúa si el hongo puede infectar la planta sin herida en el tejido o si solo es patogénico cuando hay una herida en el tejido.

Por ende, poder realizar una caracterización completa y confiable es necesario combinar la identificación morfológica, con la molecular y la patogénica (Abang et al., 2006; Hyde et al., 2009).

## **Medidas de control**

El manejo correcto de una enfermedad envuelve el conocimiento del patosistema con el que se va a trabajar, ya que la enfermedad conlleva la interacción entre estos componentes (Egesi et al., 2009). Entre las prácticas culturales más utilizadas se recomienda el estacado, ya que éste provee exposición del follaje a la luz solar para mayor fotosíntesis y mayor aeración entre el follaje para evitar alta humedad, lo cual favorece la germinación de los hongos fitopatógenos (Cardona, 2007). Otra de las prácticas que han demostrado ser efectivas para controlar la antracnosis lo es el intercalado de la especie *D. alata* que es altamente susceptible, con *D. rotundata* que es más tolerante para reducir el grado de severidad en la enfermedad (Mignucci et al., 1988, Román et al., 1991). En el Caribe y demás países tropicales, uno de los factores que ha contribuido a la dispersión de la enfermedad y a que ésta cause grandes pérdidas, es el sembrar continuamente cultivares susceptibles como lo son los de *D. alata* (Onyeka et al., 2006). El control de malezas utilizando herbicidas también es una práctica importante ya que reduce las fuentes de inóculo alrededor de las plantas. Por otro lado, la selección de un material limpio es indispensable para establecer un cultivo libre de enfermedades, esto se logra mayormente mediante la micropropagación *in vitro* (Liu et al., 1990; Asiedu y Sartie, 2010).

Existen una gran cantidad de fungicidas utilizados en el control químico de esta enfermedad en diferentes cultivos. La mayoría de los métodos de control de enfermedades en este cultivo son dirigidos a la semilla (Román et al. 1984, Oramas et al., 1990, Okigbo, 2003). Los fungicidas controlan parcialmente la antracnosis, sin embargo, estos requieren de

aplicaciones mensuales y bisemanales, lo que no resulta favorable para los agricultores ya que además de que incrementa la labor y costos de producción, puede ser dañino para el ambiente (Mignucci et al., 1988, Onyeka et al., 2006; Palaniyandi et al., 2011; Asiedu y Sartie, 2010). En Puerto Rico, el fungicida más utilizado por los agricultores es Quadris® (23% i.e. azoxystrobin). Éste es un fungicida de amplio espectro con propiedades sistémicas y curativas. Se puede aplicar en forma de aspersiones foliares y combinarse con otros fungicidas registrados, pero no es una opción favorable ya que se considera de alto riesgo por el potencial desarrollo de resistencia en *Colletotrichum* spp. (FRAC CODE List, 2013). Actualmente son muy pocas las opciones de control químico de esta enfermedad en P. R. En el año 1997 en Puerto Rico, el fungicida registrado para controlar la antracnosis en ñame era Benomyl-Benlate, éste se aplicaba cuando se observaba la presencia de los síntomas y se repetía cada 3 a 4 semanas (Plaguicidas Ingresos y Gastos, 1997). Sin embargo, éste se dejó de aplicar ya que el uso continuo desarrollo resistencia del patógeno reduciendo su eficacia.

La selección de variedades resistentes es una de las alternativas más importantes ya que la aplicación de fungicidas se complica por la limitación de productos registrados y no es costo efectiva para los agricultores (Onyeka, 2006; Raj, 2012). En Puerto Rico, *D. rotundata* es la especie más sembrada por los agricultores ya que presenta mayor resistencia a la enfermedad y tiene buen precio de venta (Mignucci et al., 1988). A pesar de esto, cultivares de *D. alata* como Diamantes, Forastero y Kabusach han demostrado ser tolerantes a la antracnosis aun sin ser estacadas (González-Vélez, 2006). En estudios anteriores en Nigeria han clasificado el cultivar Forastero de *D. alata* como resistente. Es por esto que se recomienda la evaluación continua de las diferentes variedades de *D. alata* para identificar posible resistencia a la enfermedad. Además, se ha demostrado que a pesar de que hay cultivares que se muestran susceptibles a la

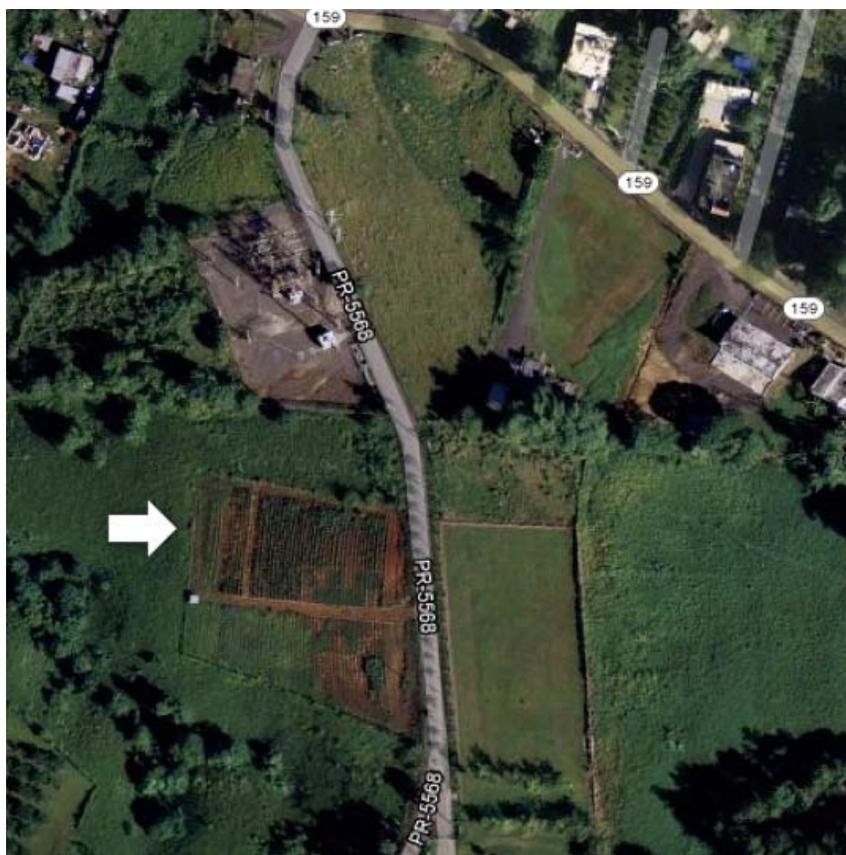
enfermedad, estos pueden tener un buen rendimiento de tubérculo fresco. Sin embargo, se ha observado que *C. gloeosporioides*, tiene una alta diversidad genética, desarrollando nuevas cepas virulentas que pueden afectar la resistencia que tengan ciertas especies o cultivares de ñame (Mignouna et al., 2001; Abang et al., 2006, Campo-Arana, 2011). Es por esto, que es de suma importancia entender las variaciones entre el hospedero y el patógeno para poder sacar provecho de la resistencia de las plantas. La respuesta de la resistencia de los cultivares de ñame no se puede evaluar desde un sólo punto de vista, ya que en algunos casos la enfermedad puede comenzar en etapas tempranas del cultivo, pero con un desarrollo lento y en otros casos ésta puede ocurrir en etapas donde el cultivo está más maduro, pero la enfermedad se desarrolla más rápido (Onyeka et al., 2006). Esto es debido a que mientras más maduro esté el cultivo, posiblemente esté en estado de senescencia donde el tejido está más débil y susceptible a cualquier patógeno. Además de esto, se ha reportado que las plantas con una cutícula más gruesa, estomas más cortos y mayor acumulación de fenoles en las hojas son más resistentes que las que no tienen estas características (Egesi et al., 2007).

El control biológico es otra alternativa que se utiliza para controlar el crecimiento de este hongo por medio de antagonismo. Palaniyandi (2011) reportó a la bacteria *Streptomyces* sp. como una alternativa para controlar el crecimiento de *Colletotrichum* sp. y para disminuir la severidad de la antracnosis en *D. batatas*. Esta bacteria *in vitro* inhibió el crecimiento del hongo hasta un 65%.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Evaluación de la colección de germoplasma

Se utilizó la colección de germoplasma de ñame (*Dioscorea* spp.) localizada en la Estación Experimental Agrícola de Corozal (N 18°11.168' W 066°18.379) (Figura 6), para la recolección de muestras foliares y aislación de *Colletotrichum* spp. El muestreo se realizó el 29 de agosto, el 12 de agosto y 18 de septiembre de 2012. Los terrenos de la Estación Experimental en Corozal tienen una elevación de 200 m sobre el nivel del mar, con suelos profundos, ácidos y con un declive de 5% a 12%, el clima es subtropical, las temperaturas fluctúan entre 26°C a 35°C, y el pH del suelo fluctúa entre 5.0 a 5.5 (Irizarry y Rivera, 1993).



**Figura 6.** Colección de germoplasma de ñame ubicada en la Estación Experimental Agrícola de Corozal (N 18°11.168' W 066°18.379).

Esta colección estaba compuesta por 23 cultivares de ñame, representadas en cinco especies; *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. esculenta* y *D. trifida*. De la especie *D. alata* se evaluaron los cultivares Gunung, Diamantes, Binugas, Kinabayo, Kabusach, Del Monte, PI 15587, PI 15567, Forastero y Purmay. De la especie *D. rotundata* se evaluaron los cultivares Colombiano, Guinea Negro y Geño. De la especie *D. esculenta* se evaluaron los cultivares PI 13347, Muni, Doli, PI 11346, PI 11345, Kombi, Seti y Beti. De la especie *D. cayenensis* se evaluó el cultivar PI 15520 y de la especie *D. trifida* el cultivar Mapuey. El predio estaba organizado en cuatro hileras por cultivar con 10 plantas por hilera, para un total de 40 plantas por cultivar.

El predio fue arado, rastrillado y se realizaron bancos de siembra. La distancia entre plantas fue de 0.30 m y entre bancos fue de 1.21 m. Se utilizó riego natural, se le aplicaron 4 onzas del fertilizante 14 N -3 P- 13 K en dos aplicaciones, a los dos y cinco meses de siembra. Se aplicaron los fungicidas Quadris® (23% Azoxystrobin) y Kocide® 3000 (Copper Hydroxide 46.1%) y los herbicidas Clomazon [2(2-clorofenil)metil-4, 4-dimetil-3]] pre-emergente y Paraquat [Dicloruro de 1-1dimetil-4,4 bipiridilo (V)] post-emergente para el manejo de malezas.

Los síntomas a evaluar fueron manchas y necrosis en las hojas, pecíolos y tallos de la planta. Se colectaron de tres a cuatro muestras de tejido con diferente sintomatología dentro de cada variedad de ñame.

### **Catastro en municipios de mayor producción de ñame**

Se realizó un catastro alrededor de la isla en los pueblos de mayor producción de ñame de acuerdo con el Censo Agrícola de 2012 (USDA, 2012). Con el propósito de evaluar los daños foliares en el cultivo, se visitaron fincas comerciales en cada pueblo seleccionado (Figura 7). En

San Sebastián y Barranquitas se visitaron tres fincas; en Moca, San Lorenzo y Utuado se visitaron dos fincas; y en Aguada se visitó una finca. En cada finca se completó un formulario con información de las especies de ñame sembradas, datos climatológicos, características del cultivo y del predio y comentarios de los agricultores (Apéndice A). Los datos climatológicos se obtuvieron de la página web de la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) y las ubicaciones del predio se obtuvieron utilizando un Sistema de Posicionamiento Global (GARMIN, Oregon 550t). Se tomaron fotos del predio y de los síntomas observados y se colectaron muestras para ser procesadas en el laboratorio. Además, se determinó el porcentaje de necrosis foliar en cada finca, utilizando una escala visual previamente desarrollada para *Colletotrichum* en ñame (Egesi, 2007). Esta escala consistía de cinco niveles, donde 1= ningún síntoma, 2= síntomas moderados o leves, 3= síntomas severos, 4= bastante severo y 5= más del 50% del tejido en las plantas estaba enfermo.



**Figura 7.** Seis pueblos en Puerto Rico de mayor producción de ñame a ser evaluados: Moca, San Sebastián, Aguada, Utuado, Barranquitas y San Lorenzo. Tomado de: [www.salonhogar.net](http://www.salonhogar.net).

El muestreo de las fincas y de la colección de germoplasma se realizó del follaje en pleno desarrollo vegetativo (plantas de más de tres meses). Se colectaron hojas con los diferentes síntomas que presentaba cada variedad y se colocaron en bolsas plásticas dentro de una nevera con hielo para mantenerlas frescas durante el transporte. Luego, se llevaron al laboratorio de Fitopatología de la Subestación Experimental Agrícola de Isabela para ser procesadas. Los síntomas se describieron detalladamente y se observaron bajo el estereoscopio (Olympus SZ61, S22-ILST, 8E07493) para observar posibles estructuras del agente causal en las lesiones. Se tomaron fotos de las muestras y se procedió con el aislamiento en medios de cultivo artificial. Se cortaron pedazos de 5 mm de tejido sano y tejido sintomático y se desinfectaron superficialmente con alcohol etílico al 70%, hipoclorito de sodio al 10% y agua destilada estéril por un minuto cada uno (Agrios, 2005). Una vez completado este proceso, el tejido se colocó en papel secante estéril y luego se aislaron en Agar de Papa Dextrosa (PDA; Difco Laboratories) (Apéndice B-1) y se incubaron a 25°C por siete días. Las colonias de hongos que crecieron en el medio se transfirieron a PDA nuevamente para purificarlos. El aislamiento de las bacterias se realizó colocando los pedazos de tejido en tubos de centrifuga estériles con agua destilada estéril y se agitaron por un minuto. Luego, se realizaron estriados en Agar Nutritivo (NA; Difco Laboratories; Apéndice B-2) y se incubaron a 25°C por 48 horas. De los aislados obtenidos se realizó una lista de códigos organizada de acuerdo a la especie de ñame, la variedad y el aislado (Apéndice C).

### **Caracterización morfológica de los aislados**

Las colonias de hongos se caracterizaron y se describieron de acuerdo al color del micelio, textura y formación de sectores. Se prepararon laminillas semipermanentes y se examinaron bajo el microscopio (Olympus, BH2). Se utilizaron claves pictóricas, dicotómicas,

y artículos científicos para la caracterización (Barnett, 1998, Stevens, 1974, Cannon et al., 2012, Chowdappa et al., 2012; Damm et al., 2012; Rojas et al., 2010; Weir et al., 2012, Prihastuti et al., 2009).

Los morfotipos de hongos identificados como *Colletotrichum* spp. se cultivaron en agar de habichuelas tiernas para inducir su esporulación (Apéndice B-3; GBA; Figura 8; Biles, 1990). Con estos aislados se realizaron curvas de crecimiento en PDA. Se colocaron discos de micelio de 5 mm en el centro del plato Petri con PDA, se incubaron a 28°C por 7 días y se midió el crecimiento micelial cada 24 horas (Crouch et al., 2009; Rojas et al., 2010; Tous-Villareal, 2008). De los aislados de hongo se prepararon laminillas en lactofenol y se observaron bajo el microscopio (Olympus, BH2) para determinar la forma y tamaño de los conidios y otras estructuras de reproducción de los morfotipos de *Colletotrichum*. La descripción de conidios y apresorios, se realizó midiendo 25 conidios y 25 apresorios seleccionados al azar utilizando el programa PAX-it™ Imaging Software a una magnificación de 40x. Las fotos fueron tomadas a una magnificación de 100x. Para inducir la formación de los apresorios se colocó un cuadrado de PDA de aproximadamente 5 cm que contenía micelio del hongo sobre una laminilla con la parte del micelio hacia arriba y encima se le colocó un cubreobjeto de plástico (Chaky et al., 2001). La laminilla se colocó dentro de una placa Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. Los platos se sellaron con parafina y se incubaron a 28°C bajo luz constante. Luego de tres a cinco días, el cubreobjeto se removió y se colocó en una nueva laminilla con una gota de lactofenol (Baquero, 2002; Rojas et al., 2010; Weir et al., 2012).

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 bioquímicas como catalasa, oxidasa y reacción a KOH.



**Figura 8.** Aislados de *Colletotrichum* spp. mostrando los diferentes tipos de esporulación en medio de cultivo de agar de habichuelas tiernas. Se observó mayor esporulación en este medio (GBA).

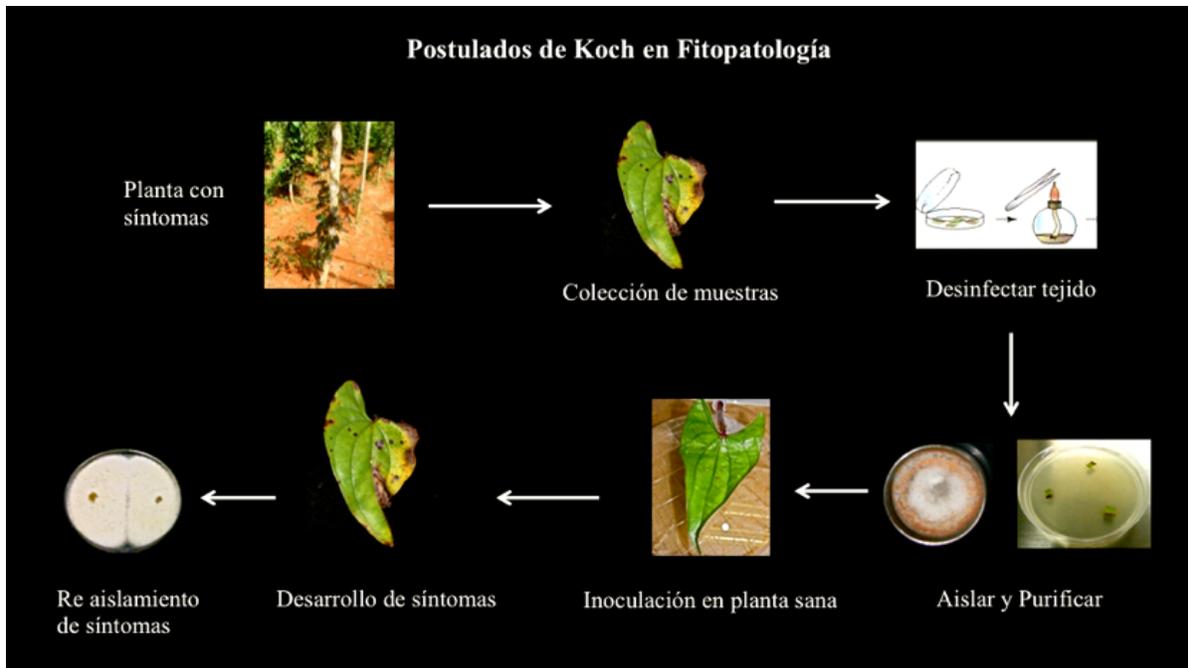
### **Pruebas de patogenicidad de aislados de *Colletotrichum* spp.**

Con los aislados identificados como *Colletotrichum* spp. se realizaron pruebas de patogenicidad siguiendo los Postulados de Koch (Figura 9). Estos aislados se transfirieron a GBA para preparar una solución de los conidios ( $10^6$  conidia /mL). Para esto, se colocó agua destilada estéril sobre el plato Petri y se rasparon los conidios suavemente de la superficie del plato. Luego, se filtró la solución acuosa con los conidios a través de una gasa estéril en un tubo de centrifuga de 50 mL para separar los residuos de micelio y agar de los conidios. El tubo con la solución se colocó en el vortex (Fisher Scientific, G-560) por un minuto. Luego, se añadieron 1000  $\mu$ L de esta solución a un microtubo de 1.5  $\mu$ L y este se colocó en la centrifuga (Eppendorf, Centrifuge 5415) por 10 minutos a 10,000 rpm. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante en el tubo con la solución y se le añadieron 1000  $\mu$ L de agua destilada estéril, se mezcló y se centrifugó nuevamente. Este paso se repitió tres veces para limpiar los conidios (Chaky et al., 2001). Luego, se colectaron 10  $\mu$ L de la solución con una micropipeta y se colocaron en un hemacitómetro para determinar la concentración de los conidios (Baquero, 2002; Sosthène et al., 2012). Se prepararon cámaras húmedas en cajas plásticas previamente desinfectadas (Figura 10). Las hojas de las respectivas especies de ñame, de donde se obtuvieron los aislados de *Colletotrichum* spp., se colocaron encima de placas Petri para evitar el contacto directo con el agua. El experimento consistió de dos tratamientos; conidios con herida, conidios sin herida, y dos controles; agua destilada estéril con herida y agua destilada estéril sin herida. En el caso de no lograr obtener las concentraciones de conidios deseadas por la poca esporulación de los aislados, entonces se realizaron las pruebas de patogenicidad utilizando un disco de micelio de 5 mm, en vez de la suspensión de conidios. Cada tratamiento incluyendo los controles consistió de tres replicas y dos repeticiones. Las cámaras húmedas fueron incubadas a

temperatura ambiente para el desarrollo de síntomas. De desarrollarse alguna lesión ésta era aislada en PDA para confirmar la patogenicidad de dichos aislados y completar los postulados de Koch. La severidad de las lesiones se midió utilizando una escala de severidad visual (Tabla 1; Preston, 2008). Estos aislados se separaron en grupos de acuerdo al nivel de severidad.

**Tabla 1.** Escala establecida para determinar la severidad de los diferentes aislados de *Colletotrichum* spp.

<b>Nivel</b>	<b>Porcentaje de severidad</b>
<b>0</b>	0% Ningún tipo de lesión en el tejido.
<b>1</b>	≤ 20% de tejido infectado
<b>2</b>	21-40% de tejido infectado
<b>3</b>	≥ 41% de tejido infectado



**Figura 9.** Diagrama ilustrando los postulados de Koch utilizados para confirmar la patogenicidad de diferentes organismos.



**Figura 10.** Arreglo de las pruebas de patogenicidad *in vitro* en tejido foliar. Tres replicas por cada tratamiento.

### **Caracterización molecular de los aislados de *Colletotrichum***

Los hongos fueron transferidos en 100 mL de caldo de papa y dextrosa (PDB; Difco Laboratories; Apéndice B-4) en matraces de 125 mL y se colocaron en un agitador por 7 días a 28°C. Luego de esto, el micelio se filtró al vacío con un embudo Bunchner y papel de filtro estéril (Fernandez, 2005; Rojas et al., 2010). La extracción de ADN se realizó utilizando el Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Cat. No. 69104) siguiendo las instrucciones del fabricante con ciertas modificaciones (Apéndice D-1). Para romper el tejido se utilizó el FastPrep (Thermo ELECTRON CORP., FP120A-115), y los parámetros para este fueron de dos a tres ciclos con una velocidad de 4.5 m/sec, por 20 segundos. Las concentraciones de ADN obtenidas se midieron utilizando un nanofotómetro (NanoPhotometer P-Class, IMPLEN 5058). El DNA se conservó a -20°C hasta ser utilizado.

La amplificación por PCR se realizó utilizando iniciadores específicos para los genes ITS del ADNr (615 pb), Beta tubulina ( $\beta$ -Tubulin 2 [716 pb]) y GAPDH (308 pb) previamente descritos para la caracterización de especies de *Colletotrichum* (Tabla 2; Rojas et al., 2010; Weir et al., 2012). La reacción consistió de 10  $\mu$ L de Amplitaq Gold<sup>®</sup> (ADN Polimerasa; Applied Biosystems Cat. No. 4390939), 1.5  $\mu$ L de cada iniciador específico, 6  $\mu$ L de agua deionizada y 1  $\mu$ L de ADN con una concentración de 20 a 25 ng/ $\mu$ l, para un total de 20  $\mu$ L de reacción. Las muestras se amplificaron en un termociclador (Eppendorf AG, 22331, NJ). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización de 10 min a 95°C, 35 ciclos de 96°C por 3 seg, la temperatura de alineamiento del marcador molecular a 3 seg, la hibridización a 68°C a 15 seg y una extensión final de 72°C a 10 seg. Las temperaturas de alineamiento de los iniciadores específicos fueron: para ITS a 52°C,  $\beta$ -tubulina a 55°C y GAPDH a 58°C. Los parámetros del

PCR se establecieron según las recomendaciones del fabricante de la enzima AmplitaqGold®.

**Tabla 2.** Iniciadores específicos utilizados para amplificar las secuencias de las diferentes regiones genéticas.

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Dirección</b>	<b>Secuencia de 5'- 3'</b>
<b>ITS</b>	ITS-1F	Adelante	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A
	ITS-4	Reverso	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC□
<b>TUB2</b>	T1	Adelante	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT□
	T2	Reverso	TAG TGA CCC TTG GCC CAGT TG
<b>GAPDH</b>	GDF	Adelante	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA
	GDR	Reverso	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT

Se visualizó el producto de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% (Agarose, OmniPur™; Merck Millipore) con amortiguador de 1X Tris-acetate-EDTA y 2.5 µL de Gel Red (Gel Red™Nucleic Acid, BIOTIUM). Se utilizó 1 µL del marcador molecular de 100 pb (DNA Ladder, Promega) diluido en 4 µL de agua deionizada y 1 µL del tinte (GelPilot Loading Dye 5x, Cat. No. 239901 ). La electroforesis se corrió a 110 voltios y 400 mAmps por 60 min. El gel se visualizó en un iluminador de rayos ultravioletas (SIGMA™, T 1202). Para purificar las muestras se utilizó el QIAquick Gel Extractionn Kit Protocol (Cat. No. 28706; Apéndice D-2) siguiendo las instrucciones del fabricante, pero con ciertas modificaciones (Apéndice D-3). Las muestras se prepararon siguiendo las especificaciones de la compañía comercial para la secuenciación del ADN (Macrogen, USA). Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor, Carlsbad, CA 92008) y analizadas

observando los porcentos de calidad de cada secuencia con el programa Sequencher® 5.3 (MI, USA). Las secuencias que mostraron un porcentaje de calidad menor del 80% a 90%, se alinearon y se realizó una secuencia consenso que fue posteriormente utilizada para realizar las comparaciones. Las secuencias de nucleótidos se analizaron en BLAST del Centro Nacional para Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para examinar su similaridad con otras secuencias utilizadas como referencia (Tabla 3). Las secuencias con mayor porcentaje de similitud o homología se alinearon con la secuencia consenso o la secuencia adelante o reverso obtenida. Las secuencias que mostraron un porcentaje de calidad menor del 70% se evaluaron, pero estos datos fueron inconclusos.

Los arboles filogenéticos se realizaron con las secuencias obtenidas en este estudio y las secuencias de referencia (Tabla 3), estos se analizaron mediante el programa MEGA6.06 para realizar un alineamiento múltiple con el programa ClustalX. Como “Outgroup” se utilizó *Colletotrichum destructivum* 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”.

Se obtuvieron números de accesoión de GenBank para las secuencias de ITS, utilizando el “software” Sequin (Versión 13.70; Apéndice H).

**Tabla 3.** Secuencias de *Colletotrichum* obtenidas del GenBank y utilizadas como referencia para construir los arboles filogenéticos.

Especies	Numero de acceso		
	ITS	$\beta$ TUB	GAPDH
<i>C. tropicale</i>	KC512125.1	JX010407.1	JX010007.1
<i>C. gloeosporioides</i>	FN566872.1	JX 827449.1	JX 827437.1
<i>C. siamense</i>	JX010278.1	GQ849441.1	JX010002.1
<i>C. theobromicola</i>	KM505031.1	KF768557.1	JX009957.1
<i>C. fragariae</i>	JX258785.1	ND <sup>1</sup>	GU174564.1
<i>C. fructicola</i>	KC702988.1	KJ420049.1	JX009946.1
<i>C. aoteora</i>	NR120136.1	KC297088.1	JX009906.1
<i>C. ignotum</i>	KC790967.1	ND	JN861218.1
<i>C. alatae</i>	JX010191.1	JX010383.1	JX009990.1
<i>C. truncatum</i>	KC460308.1	KC109476.1	KC109590.1
<i>C. capsici</i>	KC790966.1	KC790966.1	KC790966.1
<i>C. destructivum (outgroup)</i> <sup>2</sup>	EU070911.1	EU070911.1	EU070911.1
<i>C. karstii</i>	KJ813594.1	ND	KM055654.1
<i>C. cliviae</i>	KC702974.1	HM585423.1	JX546611.1
<i>C. kahawae</i>	ND	KC297082.1	ND
<i>C. orchidearum</i>	ND	HM585416.1	HM585392.1

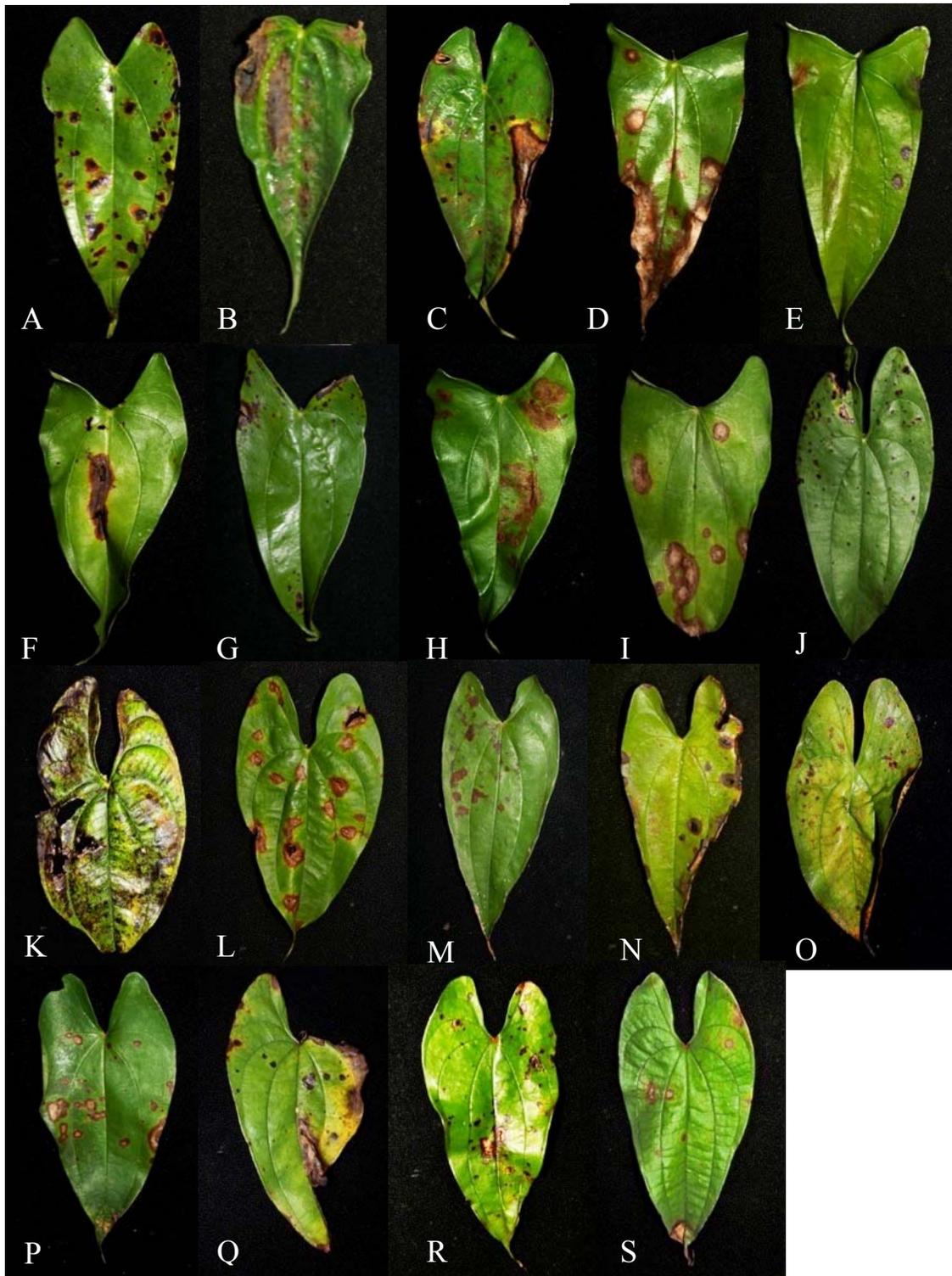
<sup>1</sup>No hay datos disponibles (estas secuencias no fueron utilizadas con estos genes).

<sup>2</sup>Aislado de *Colletotrichum* que se utilizó como outgroup para los arboles filogenéticos.

## RESULTADOS

### Evaluación de la colección de germoplasma

Durante la evaluación de la colección de germoplasma de *Dioscorea* spp. localizada en los predios de UPRM en Corozal, se observó una amplia gama de síntomas que variaron en severidad y apariencia entre las variedades, siendo las manchas necróticas irregulares predominantes. Además, se observó la aparición de síntomas en todas las variedades a partir del cuarto mes de siembra. Los síntomas observados en las variedades de *D. alata* fueron manchas necróticas en diferentes áreas de las hojas. Se observaron márgenes necróticos, necrosis con los bordes cloróticos, manchas rojizas distribuidas por toda la hoja y manchas negras circulares (Figura 11 y 12). En *D. trifida*, se observaron pequeñas manchas necróticas y necrosis en los márgenes de las hojas (Figura 13). En *D. cayenensis* manchas necróticas color marrón y necrosis en los márgenes de la hoja (Figura 14). En *D. rotundata* se observaron manchas color marrón claro dispersadas por todo el tejido, necrosis en los márgenes y centro de la hoja, y manchas negras pequeñas alrededor de todo el tejido (Figura 15). En *D. esculenta* se observaron márgenes y venación necrótica, manchas circulares color marrón rojizo, manchas irregulares necróticas con el centro seco y clorosis alrededor (Figura 16).



**Figura 11.** Síntomas evaluados en seis cultivares (cv.) de *Dioscorea alata* obtenidos de la colección de germoplasma de ñame. (A-C) cv. Binugas, (D-F) cv. Forastero, (G-I) cv. Diamantes, (J-L) cv. Del Monte, (M-P) cv. PI 15587 y (Q-S) cv. Purmay.



**Figura 12.** Síntomas evaluados en cuatro cultivares (cv.) de *Dioscorea alata*. (A-D) cv. Kabusach, (E-G) cv. Kinabayo, (H-J) cv. PI 15567 y (K-M) cv. Gunung.



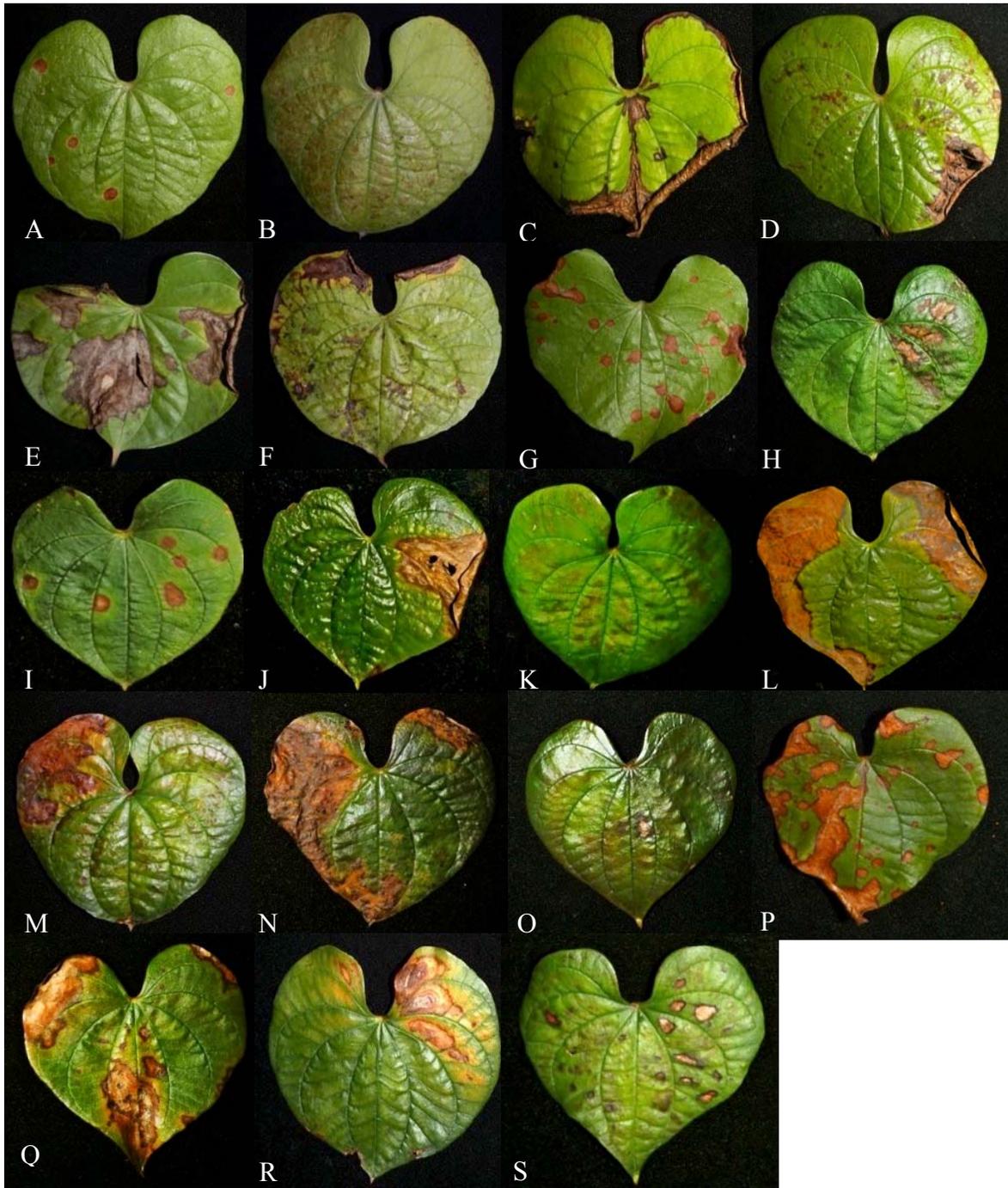
**Figura 13.** Síntomas evaluados en el cultivar Mapuey de la especie *Dioscorea trifida*.



**Figura 14.** Síntomas evaluados en el cultivar PI 15520 de la especie *Dioscorea cayenensis*.



**Figura 15.** Síntomas evaluados de tres cultivares de *Dioscorea rotundata*. (A-C) cv. Colombiano, (D-F) cv. Guinea negro y (G-I) cv. Geño.

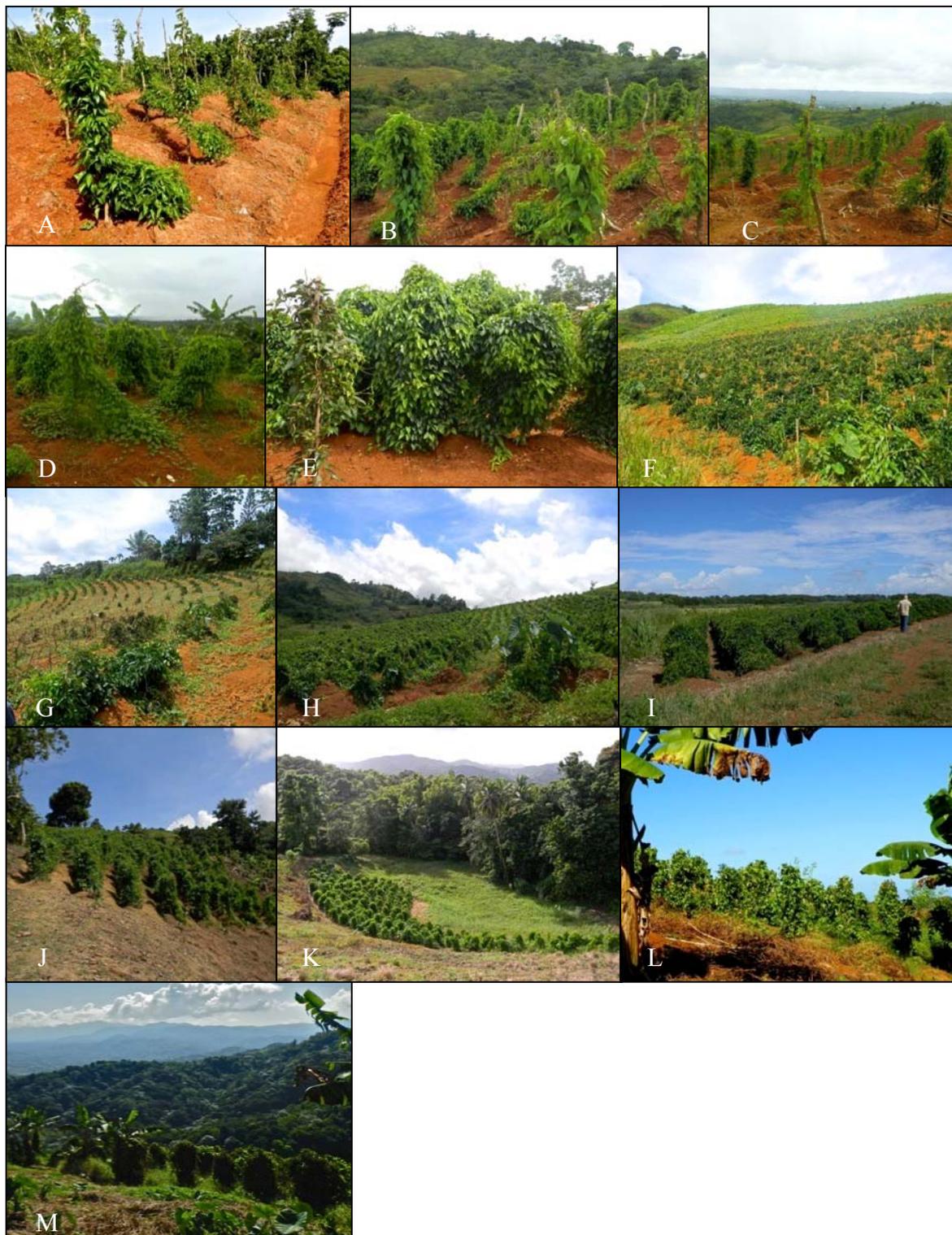


**Figura 16.** Síntomas evaluados en ocho cultivares de *Dioscorea esculenta*. (A-D) cv. Beti, (E-G) cv. Kombi, (H-I) cv. Doli, (J-K) cv. Muni, (L-M) cv. PI 11346, (N-O) cv. PI 13345, (P-Q) cv. PI 13347 y (R-S) Seti.

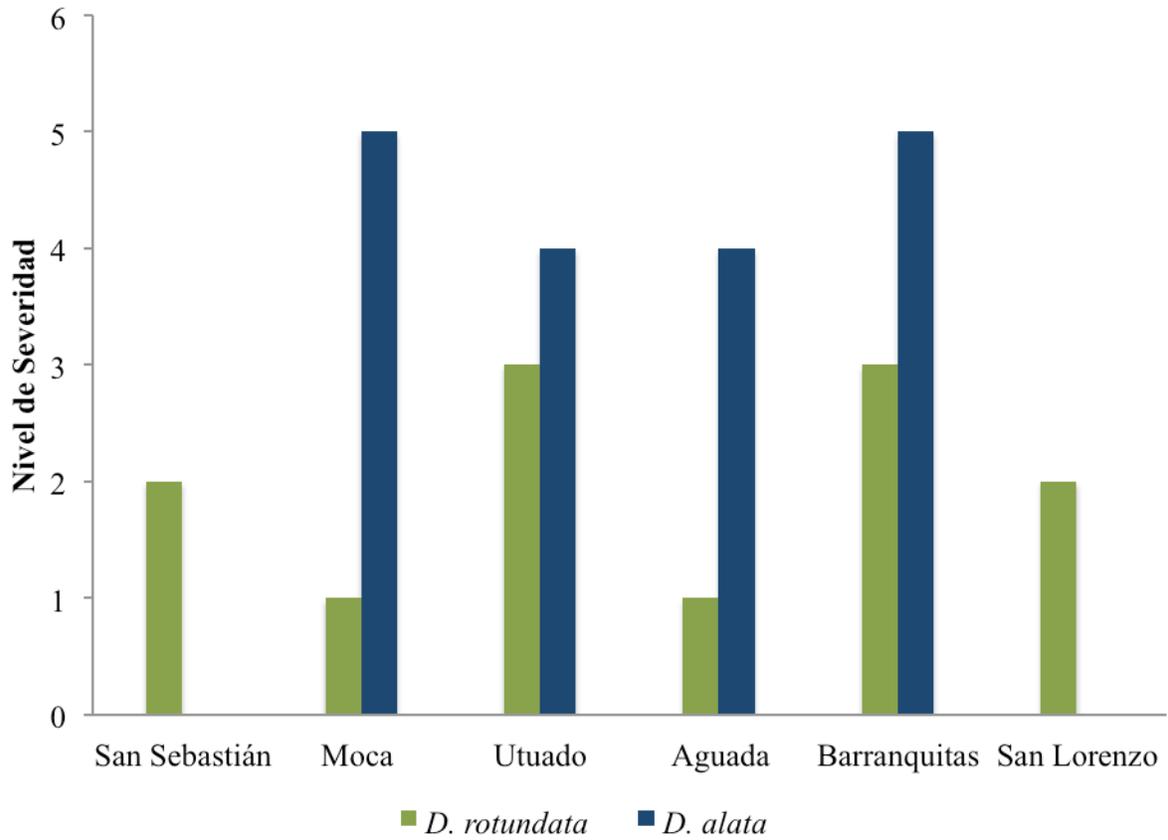
### **Catastro de enfermedades foliares en municipios de mayor producción de ñame**

Durante el catastro se observaron diferencias en términos de las especies sembradas, preparación del terreno, métodos de siembra y manejo de enfermedades. Se observó que la mayoría de los agricultores sembraban en bancos y estacaban el cultivo. En los pueblos de Moca, Utuado y San Sebastián, los agricultores preparaban el predio en montículos, sembrando de tres a cuatro semillas por montículo y estaqueando en el centro del montículo para el soporte de las plantas. Por otro lado, en los pueblos de San Lorenzo, Barranquitas y Aguada, los agricultores siembran en bancos, colocando una semilla cada 0.3 m y estaqueando los ñames a lo largo de los bancos (Figura 17). En términos de especies, *D. rotundata* cultivar Guinea es la especie más frecuentemente sembrada en todas las fincas evaluadas. La especie *D. alata* cv. Florido, solo se observó en Moca, Aguada, Barranquitas y Utuado, pero, en pequeñas cantidades (menos de tres cuerdas).

El origen de la semilla utilizada por los agricultores es de origen local y las fechas de siembra fluctuaban entre los meses de enero a marzo, dependiendo de la especie. La cosecha ocurre durante los meses de octubre a diciembre y en algunos casos en enero, dependiendo de la fecha inicial de siembra. En términos de severidad (necrosis foliar) la especie *D. alata* presentó más tejido necrótico que la especie *D. rotundata* en todas las fincas evaluadas. Las siembras localizadas en Barranquitas mostraron los mayores niveles de severidad en *D. rotundata* (nivel 3), y *D. alata* (nivel 5). Las siembras localizadas en Moca y Utuado mostraron niveles de severidad altos en *D. alata* (nivel 5) y *D. rotundata* (nivel de 3), respectivamente (Figura 18).

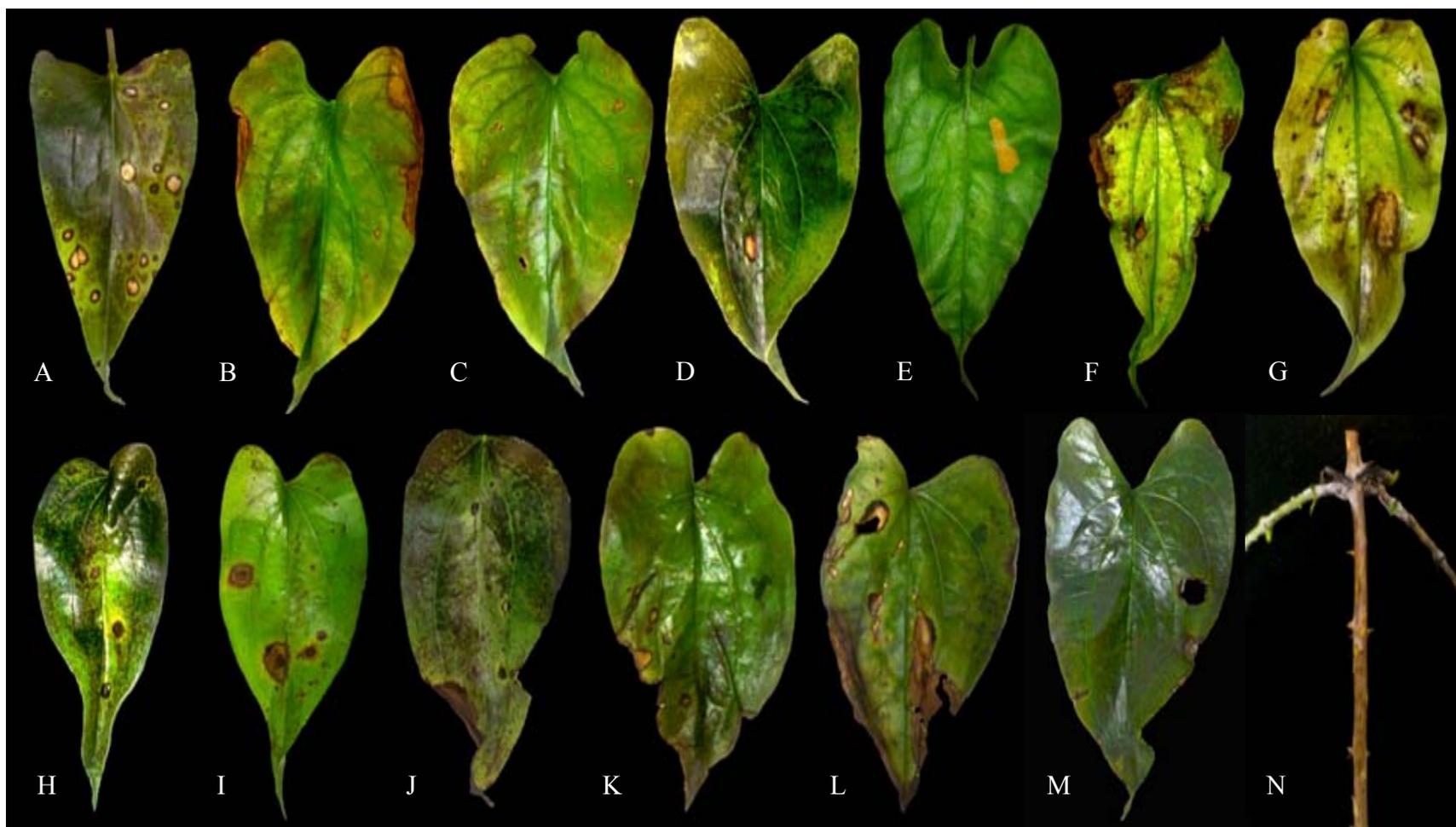


**Figura 17.** Métodos de siembra en las diferentes fincas evaluadas alrededor de la isla. San Sebastián; (A-C). Moca; (D-E). Barranquitas; (F-H). Aguada; (I). San Lorenzo; (J-K). Utuado; (L-M).



**Figura 18.** Niveles de severidad en la sintomatología observada en las especies *D. alata* y *D. rotundata* en los diferentes pueblos visitados alrededor de la isla.

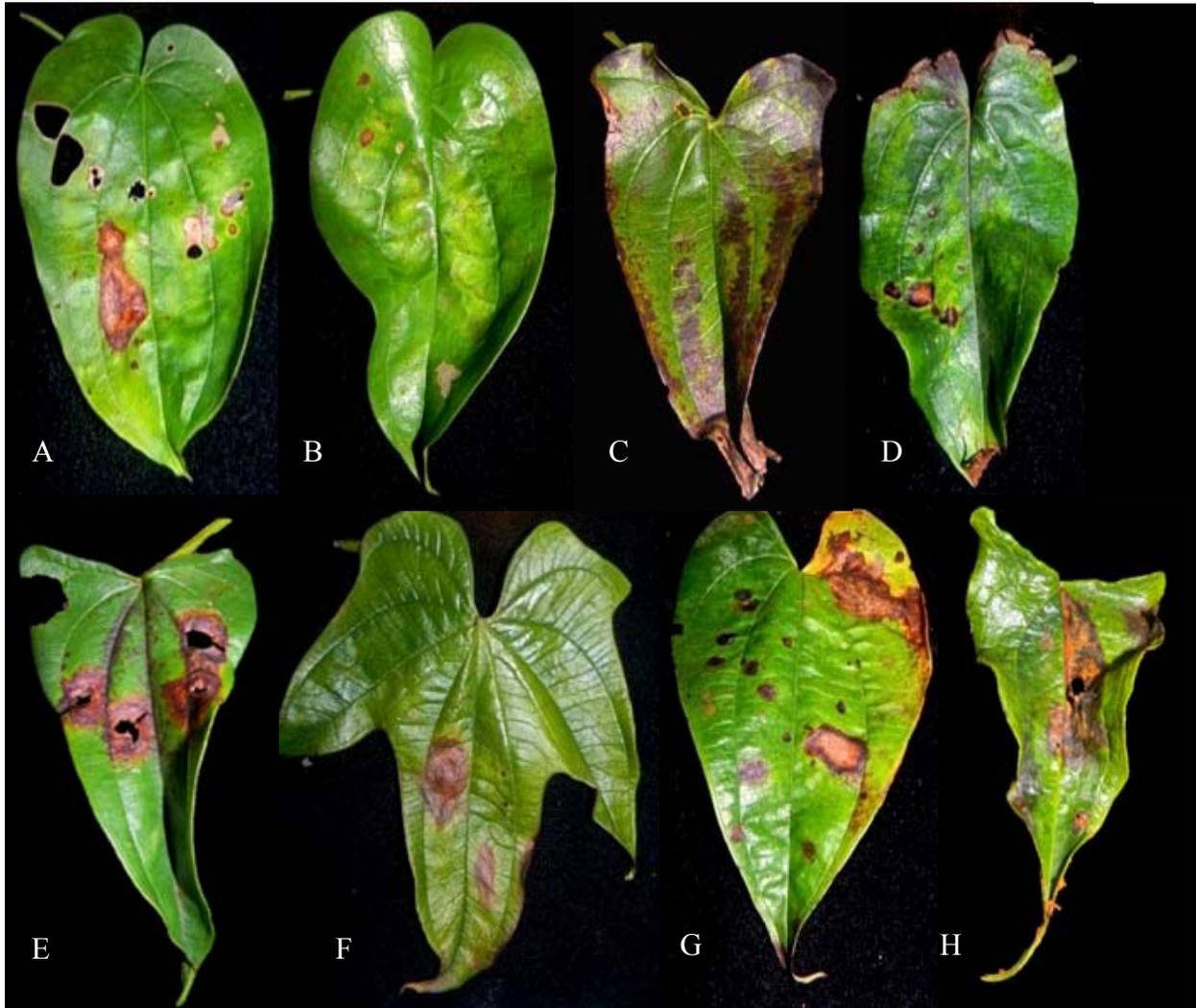
Los síntomas observados en las fincas evaluadas fueron manchas necróticas en diferentes áreas de las hojas, márgenes necróticos, manchas circulares con halo necrótico y en el centro tejido seco, clorosis, tallo con áreas necróticas y necrosis extensa en los cultivares de *D. alata*, *D. rotundata* y *D. trifida* (Figura 19-24).



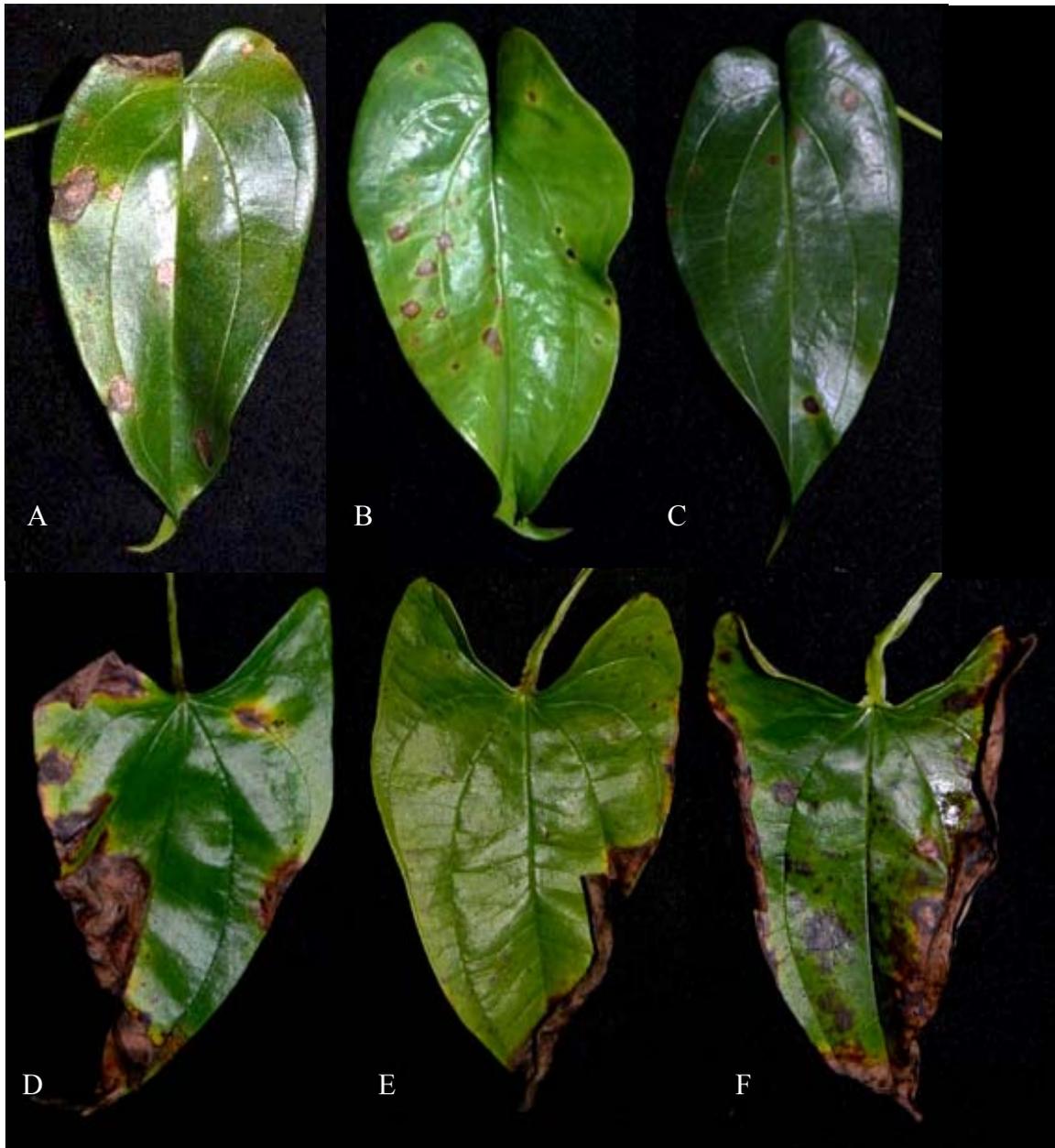
**Figura 19.** Síntomas observados en las fincas del pueblo de San Sebastián. (A) F21184, (B) F11241, (C) F11242, (D) F11243, (E) F11244, (F) F31241, (G) F31242 *Dioscorea rotundata* cv. Guinea, (H) F21181, (I) F21182, (J) F21183 *D. rotundata* cv. Guinea Negro, (K) F2122, (L) F2123, (M) F2121 *D. rotundata* cv. Colombiano y (N) 31241 *D. rotundata* cv. Guinea.



**Figura 20.** Síntomas observados en las fincas del pueblo de Moca. (A) F42241, (B) F42242, (C) F42243, (D) F42244 *Dioscorea rotundata* cv. Guinea, (E) F52251, (F) F52252, (G) F52253 y (H) F52254 *D. alata* cv. Florido.



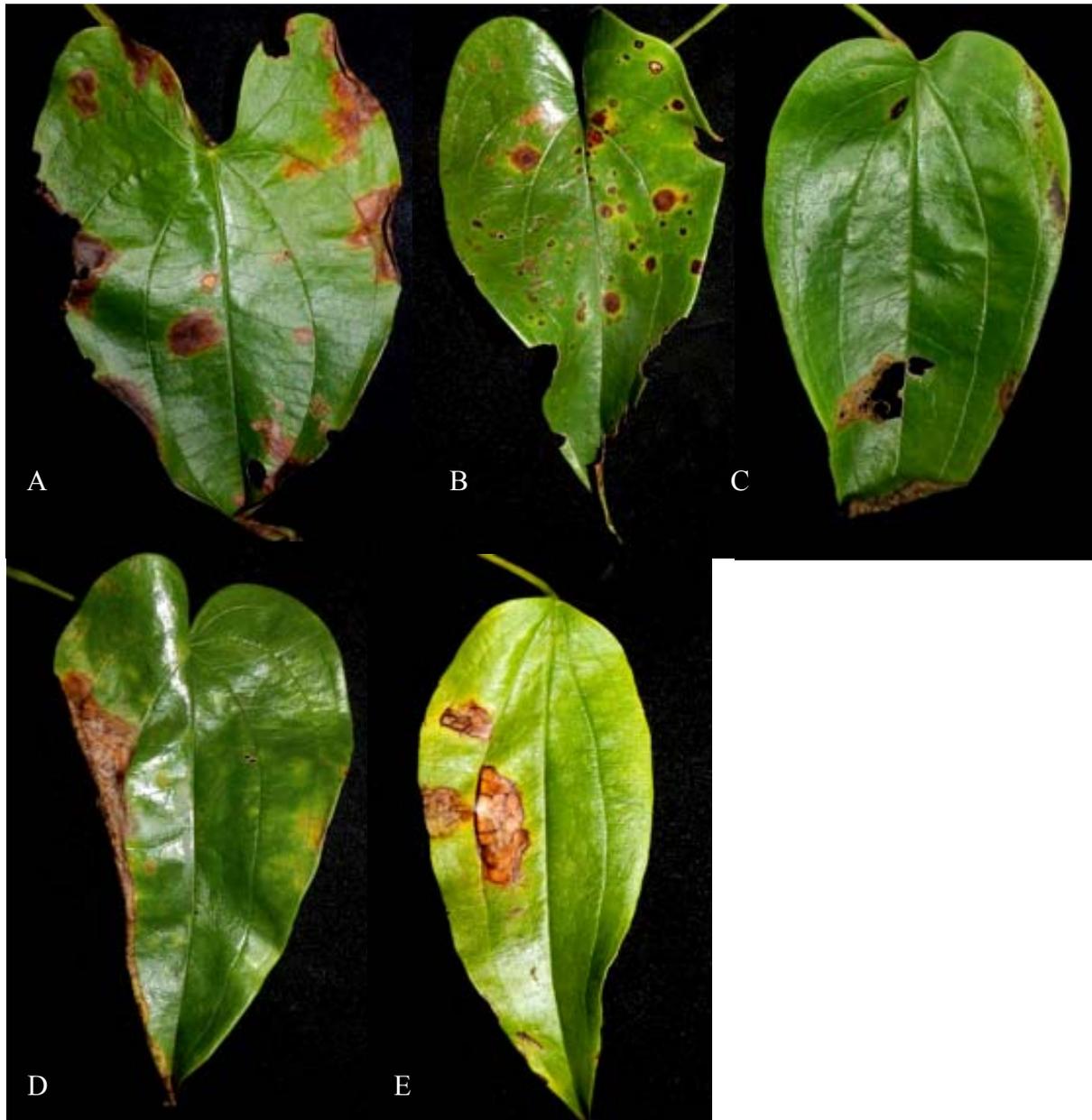
**Figura 21.** Síntomas observados en las fincas de Barranquitas. (A) F85241, (B) F85242 *Dioscorea rotundata* cv. Guinea, (C) F65251, (D) F65252, (E) F65253 *D. alata* cv. Florido, (F) F7591 *D. trifida* cv. Mapuey, (G) F75241 *D. rotundata* cv. Guinea y (H) F75251 *D. alata* cv. Florido.



**Figura 22.** Síntomas observados en las fincas de Aguada. (A) F94241, (B) F94242, (C) F94243 *Dioscorea rotundata* cv. Guinea, (D) F94251, (E) F94252 y (F) F94253 *D. alata* cv. Florida.



**Figura 23.** Síntomas observados en la especie *Dioscorea rotundata* cv. Guinea en las fincas de San Lorenzo. (A) F106241, (B) F106242, (C) F106243, (D) F116241, (E) F116242, (F) F11621 y (G) F11622.



**Figura 24.** Síntomas observados en las fincas de Utuado. (A) F133251A *Dioscorea alata* cv. Florido, (B) F133241, (C) F123241, (D) F123242 y (E) F123243 *D. rotundata* cv. Guinea.

## **Descripción y caracterización de los aislados**

### **-Colección de Germoplasma de ñame**

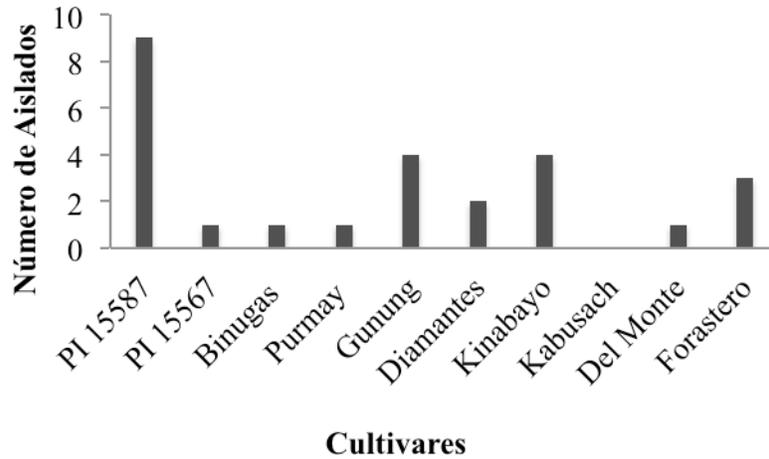
De la colección de germoplasma en los predios de la UPRM en Corozal, se obtuvieron 148 aislados de hongos dentro de las cinco especies de ñame evaluadas. De estos, el 24% de los aislados fueron identificados morfológicamente como *Colletotrichum* spp. (Tabla 4) y se obtuvieron de las cinco especies de ñame evaluadas. La especie con mayor número de aislados fue *D. alata*, observándose mayor severidad en el cultivar PI 15587 (Figura 25). Otros hongos identificados fueron: *Alternaria* sp., *Botriodiplodia* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Nigrospora* spp. y *Phomopsis* spp. (Apéndice E). Los géneros más frecuentes fueron *Botriodiplodia* spp. y *Nigrospora* spp. (Figura 26). Además se obtuvieron once aislados de bacterias, la mayoría de estas Gram negativas. Todos los aislados de bacterias resultaron positivos a la prueba de catalasa y negativos para KOH. Los aislados G83, G214 y G12 fueron positivos para la prueba de oxidasa (Tabla 5).

### **-Catastro de las fincas alrededor de la isla**

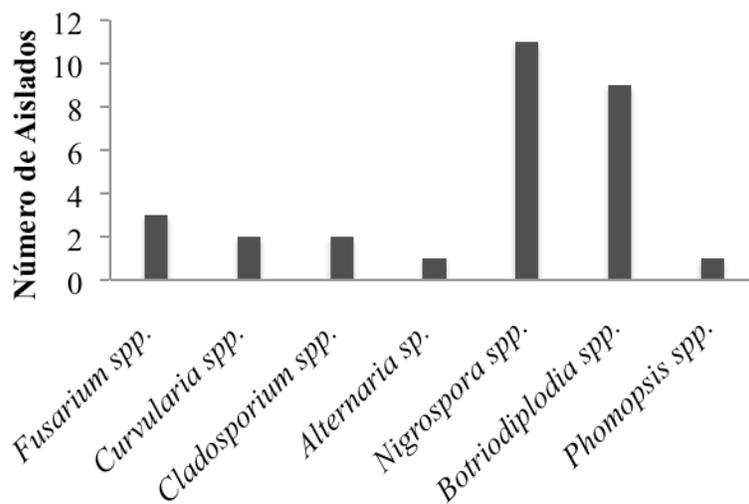
De las muestras colectadas en el catastro realizado alrededor de la isla, se obtuvieron 111 aislados de hongos. Un 27% fueron identificados morfológicamente como *Colletotrichum* spp. (Tabla 6). La especie con mayor número de aislados fue *D. rotundata* cv. Guinea, ya que ésta fue la más evaluada en las fincas, seguido por *D. alata* cv. Florido. Además, se identificaron los géneros *Botriodiplodia* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Nigrospora* spp., y *Phomopsis* spp. (Figura 27). De todos estos, *Curvularia* spp. y *Phomopsis* spp. fueron los más frecuentes.

**Tabla 4.** Cantidad total de aislados de hongos obtenidos de muestras foliares de *Dioscorea* spp. de la Colección de Germoplasma ubicada en predios de la UPRM en Corozal, Puerto Rico y el número de *Colletotrichum* spp. por especie de ñame.

<b>Especie de ñame</b>	<b>Aislados obtenidos</b>	<b>Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp.</b>
<i>Dioscorea alata</i>	75	26
<i>D. rotundata</i>	15	2
<i>D. cayenensis</i>	8	1
<i>D. trifida</i>	4	1
<i>D. esculenta</i>	46	6
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>36</b>



**Figura 25.** Aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de muestras foliares de *Dioscorea alata* de la Colección de Germoplasma ubicada en predios de la UPRM en Corozal, Puerto Rico.



**Figura 26.** Géneros de hongos identificados de muestras foliares de *Dioscorea* spp. de la Colección de Germoplasma ubicada en predios de la UPRM en Corozal, Puerto Rico.

**Tabla 5.** Características de las bacterias aisladas de las muestras obtenidas de muestras foliares de *Dioscorea* spp. de la Colección de Germoplasma ubicada en predios de la UPRM en Corozal, Puerto Rico.

<b>Aislado<sup>1</sup></b>	<b>Descripción de colonias<sup>2</sup></b>	<b>Tinción Gram</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Oxidasa</b>	<b>KOH</b>
<b>G12</b>	Colonias de forma irregular elevación plana, margen entero y color amarillo translucido.	-	+	+	-
<b>G31</b>	Colonias con forma irregular, elevación plana, margen entero y color amarilla.	-	+	-	-
<b>G32</b>	Colonias de forma irregular, elevación plana, margen entero y color amarillo translucido.	-	+	-	-
<b>G82</b>	Colonias puntiformes, elevación elevada, margen entero y color roja.	-	+	-	-
<b>G83</b>	Colonias en forma irregular, elevación plana, margen ondulado y color blanco cremoso.	-	+	+	-
<b>G162</b>	Colonias de forma irregular elevación elevada, margen entero y color amarillo translucido.	-	+	-	-
<b>G214</b>	Colonias con forma irregular, elevación plana, margen ondulado y color blanco cremoso.	-	+	+	-
<b>G221</b>	Colonias de forma circular, con elevación convexa, margen entero y color amarillo translucido.	ND <sup>3</sup>	ND	ND	ND
<b>G33</b>	Colonias con forma puntiforme, elevación elevada, margen entero y color amarilla.	ND	ND	ND	ND
<b>G21</b>	Colonias de forma irregular, elevación elevada, margen entero y color amarilla.	ND	ND	ND	ND
<b>G192</b>	Colonias puntiformes, elevación elevada, margen entero y color amarilla.	ND	ND	ND	ND

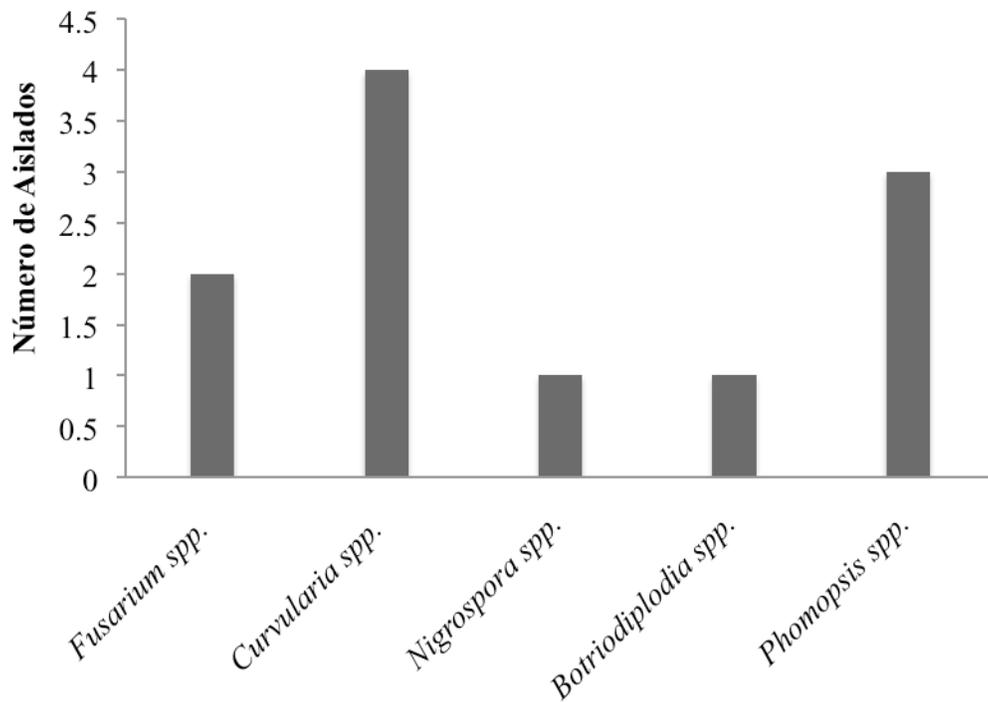
<sup>1</sup> G= se refiere a la colección de germoplasma ubicada aen predios de UPRM en Corozal, Puerto Rico.

<sup>2</sup> Descripción en medio de agar nutritivo (NA).

<sup>3</sup> No se determinó.

**Tabla 6.** Cantidad total de aislados obtenidos de muestras foliares de *Dioscorea* spp. en catastro realizado a través de la isla de Puerto Rico, y el número de *Colletotrichum* spp. por especie de ñame.

<b>Especie de ñame</b>	<b>Aislados obtenidos</b>	<b>Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp.</b>
<i>Dioscorea alata</i>	29	13
<i>D. rotundata</i>	81	17
<i>D. trifida</i>	1	0
<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>30</b>



**Figura 27.** Géneros de hongos aislados de muestras foliares de *Dioscorea* spp. en el catastro realizado a través de la isla de Puerto Rico.

### Caracterización morfológica de aislados de *Colletotrichum* spp.

Un total de 66 aislados de *Colletotrichum* spp. se obtuvieron en los muestreos realizados en la colección de germoplasma ubicada en los predios de la UPRM en Corozal y del catastro realizado en fincas privadas a través de toda la isla. De estos, 22 fueron caracterizados morfológica, patogénica y molecularmente (Tabla 7).

**Tabla 7.** Aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de muestras foliares de *Dioscorea* spp. caracterizados morfológica, patogénica y molecularmente.

<b>Aislados de <i>Colletotrichum</i></b>	<b>Especie de ñame</b>	<b>Variedad</b>
<b>G13A<sup>1</sup></b>	<i>Dioscorea alata</i>	PI 15587
<b>G12B</b>	<i>D. alata</i>	PI 15587
<b>G12D</b>	<i>D. alata</i>	PI 15587
<b>G14B</b>	<i>D. alata</i>	PI 15587
<b>G143A</b>	<i>D. alata</i>	Purmay
<b>G121B</b>	<i>D. esculenta</i>	Muni
<b>G122A</b>	<i>D. esculenta</i>	Muni
<b>G73D</b>	<i>D. alata</i>	Gunung
<b>G42B</b>	<i>D. alata</i>	Del Monte
<b>G62A</b>	<i>D. alata</i>	Forastero
<b>G61B</b>	<i>D. alata</i>	Forastero
<b>G81</b>	<i>D. alata</i>	Diamantes
<b>G23B</b>	<i>D. rotundata</i>	Colombiano
<b>G153A</b>	<i>D. alata</i>	Kinabayo
<b>F133251A<sup>2</sup></b>	<i>D. alata</i>	Florido
<b>F52253A</b>	<i>D. alata</i>	Florido
<b>F52252D</b>	<i>D. alata</i>	Florido
<b>F52251A</b>	<i>D. alata</i>	Florido
<b>F21182A</b>	<i>D. rotundata</i>	Guinea Negro
<b>F11244B</b>	<i>D. rotundata</i>	Guinea (Habanero)
<b>F11244A</b>	<i>D. rotundata</i>	Guinea (Habanero)
<b>F85241C</b>	<i>D. rotundata</i>	Guinea (Habanero)

<sup>1</sup> G= se refiere a la colección de germoplasma ubicada en los predios de la UPRM en Corozal.

<sup>2</sup> F=se refiere a fincas privadas.

### **-Descripción fenotípica de aislados de *Colletotrichum* spp. en PDA**

De acuerdo a las características de los aislados de *Colletotrichum* en PDA, estos se clasificaron en trece diferentes grupos (Tabla 8). Luego de siete días, la coloración del micelio de las colonias varió de tonalidades desde blanco, gris claro, gris oscuro, a verde oliváceo. En algunos casos se observó formación de anillos concéntricos, microesclerocios y sectores. La mayoría de estos produjeron masas de conidios de color naranja, esporulación típica del género con excepción del aislado F21182A (Figura 28- 49). Este último produjo masas de conidios de color crema sobre los microesclerocios (Figura 49).

### **-Descripción de conidios y apresorios**

Todos los conidios de los aislados de *Colletotrichum* se caracterizaron por ser hialinas, unicelulares, ovoides y rectas, excepto, los del aislado F21182A (*Colletotrichum truncatum*) (Tabla 9-10; Figura 28-49). Este aislado presentó conidios hialinos, unicelulares, falcados y curvos (Figura 49). Además, este aislados fue el único que produjo setas en medio de cultivo.

Los apresorios de todos los aislados examinados se caracterizaron por ser melanizados, pero con gran variabilidad en la forma (Tabla 10). Los aislados G23B, F11244A y G42B, produjeron pocos apresorios (Figura 35, 41 y 42) en comparación a los demás aislados.

**Tabla 8.** Clasificación de los aislados de *Colletotrichum* spp. en diferentes grupos de acuerdo a sus características fenotípicas en medio de cultivo PDA luego de siete días de incubación a 28°C.

Grupo <sup>1</sup>	Aislado	Colonias en PDA
1	G42B <sup>2</sup> ( <i>C. siamense</i> )	Micelio blanco aéreo con esporulación de masas de conidios color naranja formando anillos concéntricos y producción de microesclerocios.
	G23B ( <i>C. fructicola</i> )	
	F52252D <sup>3</sup> ( <i>C. gloeosporioides</i> )	
	G122A ( <i>C. karstii</i> )	
	G13A ( <i>C. tropicale</i> )	
2	G73D ( <i>C. tropicale</i> )	Micelio aéreo blanco, sin la producción de masas de conidios de color naranja.
	F52251A ( <i>C. alatae</i> )	
3	G12D ( <i>C. siamense</i> )	Micelio verde oliváceo en algunos casos producción de sectores y masas de conidios de color naranja mayormente en el centro del plato.
	G61B ( <i>C. cliviae</i> )	
	F85241C ( <i>C. cliviae</i> )	
	F52253A ( <i>C. alatae</i> )	
4	F133251A ( <i>C. alatae</i> )	Micelio blanco, abundante producción de conidios color naranja sobre el micelio.
5	F11244A ( <i>C. siamense</i> )	Micelio blanco y aéreo con producción de masas de conidios color naranja en el centro.
	G143A ( <i>C. tropicale</i> )	
6	F11244B ( <i>C. ignotum</i> )	Micelio blanco grisáceo, restringido a la superficie de la placa, formando anillos concéntricos color gris oscuro y sobre estos anillos esporulación color salmón.
7	F21182A ( <i>C. truncatum</i> )	Escasa producción de micelio blanco, restringido al centro de placa. Abundante producción de microesclerocios formando anillos concéntricos con masas de conidios color crema. Producción de setas estériles.
8	G14B ( <i>C. cliviae</i> )	Micelio blanco, restringido a la superficie de la placa formando anillos concéntricos. Esporulación color salmón esparcida sobre el micelio. Formación de sectoring color gris oscuro.
9	G121B ( <i>C. theobromicola</i> )	Micelio aéreo, blanco en los márgenes y gris oscuro al centro. Esporulación escasa de color salmón al centro.

<sup>1</sup> Grupos organizados de acuerdo a las características similares que presentaron los aislados de *Colletotrichum* spp.

<sup>2</sup> G= se refiere a la colección de germoplasma ubicada en los predios de la UPRM en Corozal.

<sup>3</sup> F=se refiere a fincas privadas.

**Tabla 8.** Continuación

<b>Grupo<sup>1</sup></b>	<b>Aislado</b>	<b>Colonias en PDA</b>
<b>10</b>	G62A <sup>2</sup> ( <i>C. fructicola</i> )	Micelio gris claro, aéreo y gris oscuro al centro. Sobre el micelio masas de conidios translúcidas color salmón formando anillos concéntricos.
<b>11</b>	G12B ( <i>C. gloeosporioides</i> )	Micelio aéreo, blanco en los márgenes y verde oliváceo al centro, formando anillos concéntricos, abundantes masas de conidios color naranja sobre el micelio gris. Sectores de micelio blanco con esporulación color salmón sobre éste.
<b>12</b>	G81 ( <i>C. aoteora</i> )	Micelio aéreo color verde oliváceo al centro con márgenes gris verdoso.
<b>13</b>	G153A ( <i>C. tropicale</i> )	Micelio aéreo, color desde gris oscuro hasta gris claro en los márgenes, formando anillos concéntricos. Esporulación color naranja claro al centro.

<sup>1</sup> Grupos organizados de acuerdo a las características similares que presentaron los aislados de *Colletotrichum* spp.

<sup>2</sup> G= se refiere a la colección de germoplasma ubicada en los predios de la UPRM en Corozal.

<sup>3</sup> F=se refiere a fincas privadas.

**Tabla 9.** Características morfológicas de los conidios de los aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de muestras foliares de *Dioscorea* spp.

Especie de <i>Colletotrichum</i> spp.	Aislado	Descripción	Conidios		
			Largo x Ancho (µm)		
			Min	Max	Promedio
<i>C. alatae</i>	F133251A	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	12.6 x 3.6	16.7 x 6.2	16.3 x 5.3
	F52253A	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	10.9 x 4.1	15.9 x 6.5	13.2 x 5.2
	F52251A	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices, alargada.	13.8 x 3.1	18.3 x 4.9	15.6 x 4.2
<i>C. aotearoa</i>	G81	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	12.5 x 3.9	18.0 x 6.1	15.5 x 5.2
<i>C. cliviae</i>	G61B	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	10.6 x 2.6	14.4 x 5.2	12.9 x 4.0
	G14B	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	7.2 x 4.3	9.8 x 7.6	8.0 x 5.9
	F85241C	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	11.9 x 3.3	16.4 x 5.5	14.4 x 4.4
<i>C. fructicola</i>	G62A	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	10.4 x 3.4	14.6 x 5.7	12.5 x 4.6
	G23B	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	11.0 x 3.0	15.3 x 4.6	12.5 x 3.7
<i>C. gloeosporioides</i>	G12B	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	11.7 x 3.4	14.9 x 5.8	13.2 x 4.6
	F52252D	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	11.2 x 3.5	14.9 x 6.1	12.9 x 4.7
<i>C. ignotum</i>	F11244B <sup>2</sup>	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	9.4 x 4.1	14.8 x 5.8	12.6 x 5.2
<i>C. karstii</i>	G122A	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	10.6 x 4.4	16.0 x 6.0	13.2 x 5.1
	G12D	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	10.5 x 3.5	15.4 x 5.5	12.7 x 4.5
	G42B	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	10.8 x 3.1	15.6 x 5.0	13.5 x 4.3
<i>C. siamense</i>	F11244A	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	12.5 x 5.5	15.9 x 3.9	14.2 x 4.8
	G121B	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	9.2 x 3.4	14.6 x 6.2	12.3 x 4.3
<i>C. theobromicola</i>	G13A <sup>1</sup>	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	11.5 x 3.8	14.7 x 5.3	13.3 x 4.5
	G143A	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	9.2 x 3.8	13.2 x 6.4	11.3 x 5.1
	G73D	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	12.3 x 3.1	17.9 x 6.5	14.2 x 4.6
	G153A	Ovoide, cilíndrica, obtusa en los ápices.	11.4 x 3.5	16.7 x 5.5	14.4 x 4.6
<i>C. truncatum</i>	F21182A	Falcada, fusiforme, ápices agudos.	19.3 x 3.1	26.6 x 5.9	23.2 x 4.1

<sup>1</sup>G= se refiere a la colección de germoplasma ubicada en los predios de la UPRM en Corozal.

<sup>2</sup>F=se refiere a fincas privadas.

**Tabla 10.** Características morfológicas de los apresorios de los aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de muestras foliares de *Dioscorea* spp.

Especie de <i>Colletotrichum</i> spp.	Aislado	Descripción	Apresorio		
			Largo x Ancho (µm)		
			Min	Max	Promedio
<i>C. tropicale</i>	G13A <sup>1</sup>	Marrón, claviforme, margen entero, a veces irregular.	5.8 x 3.7	7.6 x 5.8	6.5 x 4.7
	G143A	Abundante, claviforme, margen irregular.	6.8 x 3.0	14.4 x 7.1	10.3 x 5.7
	G73D	Moderadamente abundante, marrón oscuro, circular, margen entero.	5.8 x 4.1	10.5 x 6.5	8.0 x 5.1
	G153A	Moderadamente abundante, marrón, clavate, o alargado, margen entero.	6.3 x 3.2	19.7 x 8.3	11.0 x 6.1
<i>C. theobromicola</i>	G121B	Abundante, marrón, circular o clavate, cortos, margen entero.	7.0 x 4.4	11.8 x 6.7	8.9 x 5.6
<i>C. ignotum</i>	F11244B <sup>2</sup>	Marrón a marrón oscuro, abundante, margen entero, claviforme a fusiforme.	7.6 x 4.0	11.5 x 6.9	9.0 x 5.6
<i>C. gloeosporioides</i>	G12B	Marrón a marrón oscuro, claviforme, margen liso a veces irregular.	4.7 x 3.6	7.4 x 5.5	6.5 x 4.5
	F52252D	Moderadamente abundante, marrón, circular, margen entero.	5.1 x 4.8	8.3 x 7.5	7.0 x 5.7
<i>C. siamense</i>	G12D	Poca producción, marrón, circular, margen entero.	5.7 x 3.8	15.1 x 7.5	8.8 x 5.6
	G42B	Escasos, marrón oscuro, margen un poco irregular.	8.2 x 4.3	9.3 x 5.2	8.8 x 4.8
	F11244A	Escasos, marrón, circular o clavate, margen entero.	6.7 x 4.8	14.7 x 8.7	9.1 x 6.5
<i>C. alatae</i>	F133251A	Moderadamente abundante, simple, circular, marrón claro, margen entero.	6.5 x 5.0	10.6 x 8.5	7.8 x 6.4
	F52253A	Abundante, marrón, clavate, margen entero.	7.0 x 4.1	10.9 x 6.8	8.8 x 5.8
	F52251A	Abundante, marrón, circular, margen entero.	5.1 x 4.7	8.2 x 6.5	6.6 x 5.5
<i>C. fructicola</i>	G62A	Moderadamente abundante, clavate, margen irregular, marrón.	7.1 x 5.1	11.1 x 7.6	9.3 x 6.4
	G23B	Escasos, marrón oscuro, clavate, margen irregular.	10.3 x 5.1	14.3 x 6.8	12.3 x 5.9

<sup>1</sup> G= se refiere a la colección de germoplasma ubicada en los predios de la UPRM en Corozal.

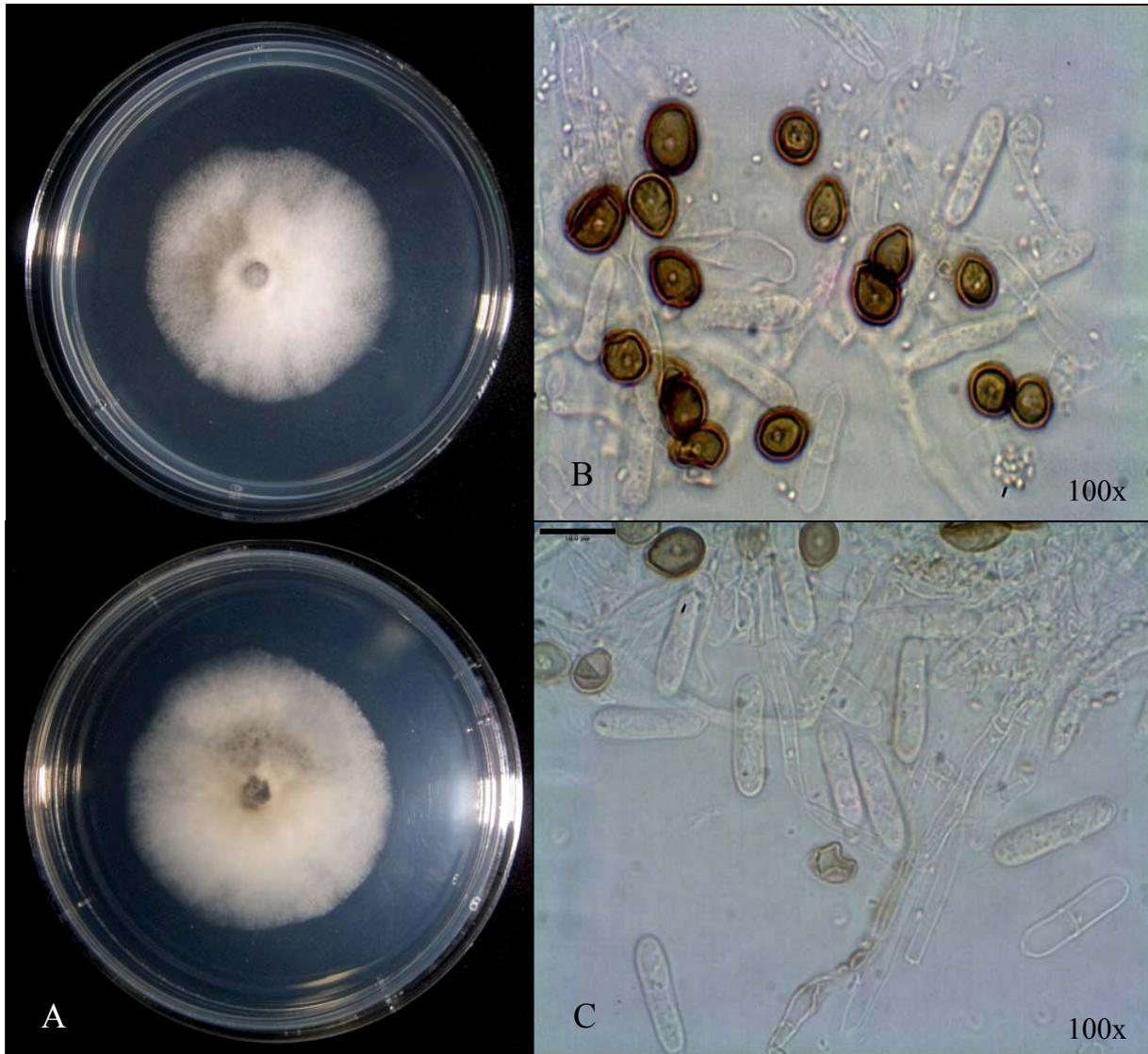
<sup>2</sup> F=se refiere a fincas privadas.

**Tabla 10.** Continuación

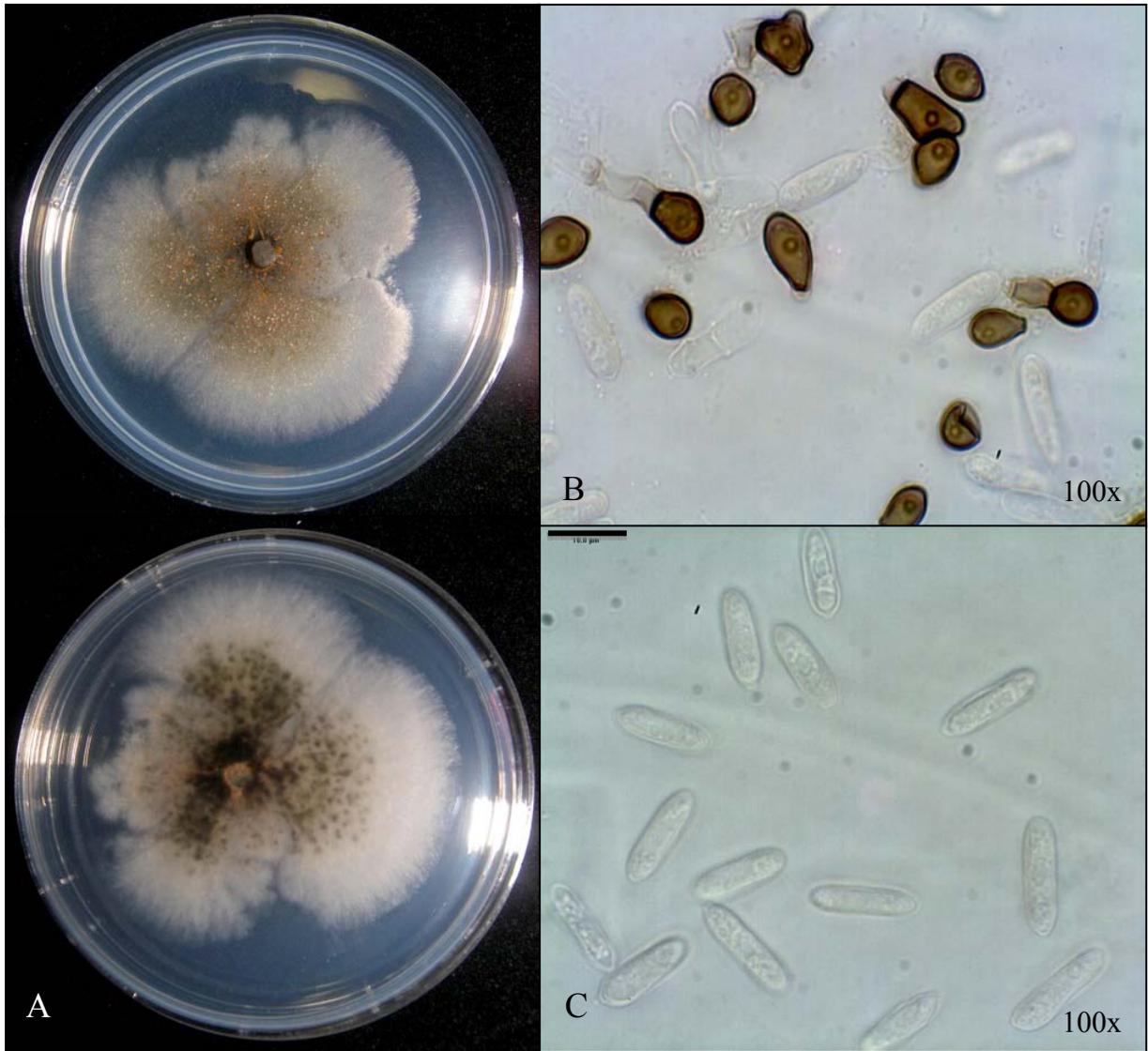
Especie de <i>Colletotrichum</i> spp.	Aislado	Descripción	Apresorio		
			Largo x Ancho (µm)		
			Min	Max	Promedio
<i>C. truncatum</i>	F21182A	Abundante, marrón, clavate, alargado, margen irregular.	8.0 x 3.4	26.6 x 10.8	14.6 x 6.7
<i>C. aoteora</i>	G81	Abundante, marrón, clavate, alargado, margen un poco irregular.	7.2 x 5.4	24.7 x 9.5	13.4 x 7.5
<i>C. cliviae</i>	G61B	Marrón a marrón oscuro, alargado o circular, margen entero.	4.5 x 3.9	12.0 x 5.6	7.4 x 4.9
	G14B	Escaso, marrón a marrón oscuro, clavate, margen irregular.	10.1 x 4.7	15.1 x 6.7	11.9 x 5.4
	F85241C	Abundante, marrón o marrón oscuro, margen irregular.	7.0 x 4.6	10.5 x 7.4	8.6 x 5.9
<i>C. karstii</i>	G122A <sup>1</sup>	Moderadamente abundante, marrón, clavate o circular, margen entero.	8.5 x 4.6	14.3 x 8.0	10.3 x 6.6

<sup>1</sup>G= se refiere a la colección de germoplasma ubicada en los predios de la UPRM en Corozal.

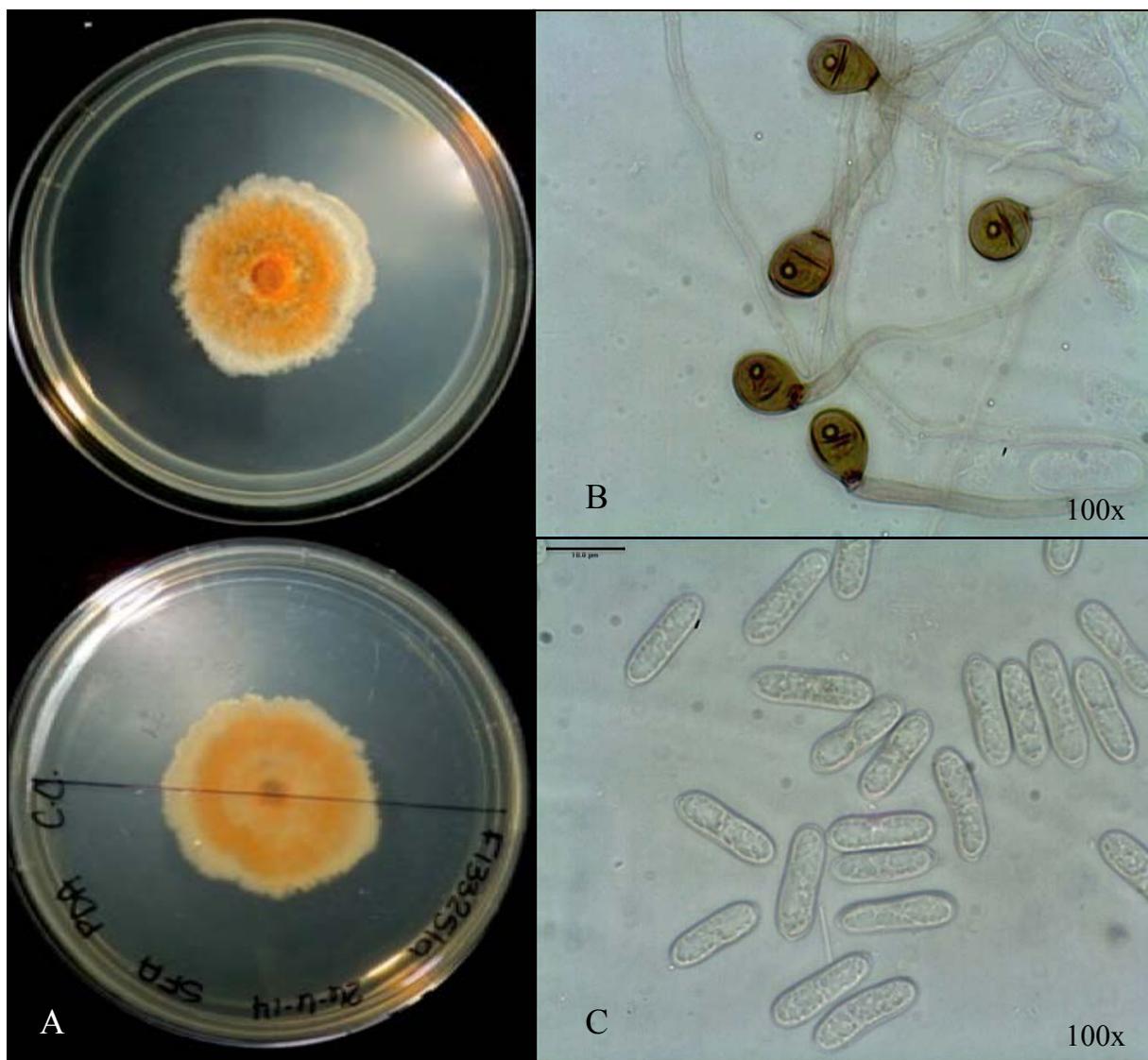
<sup>2</sup>F=se refiere a fincas privadas.



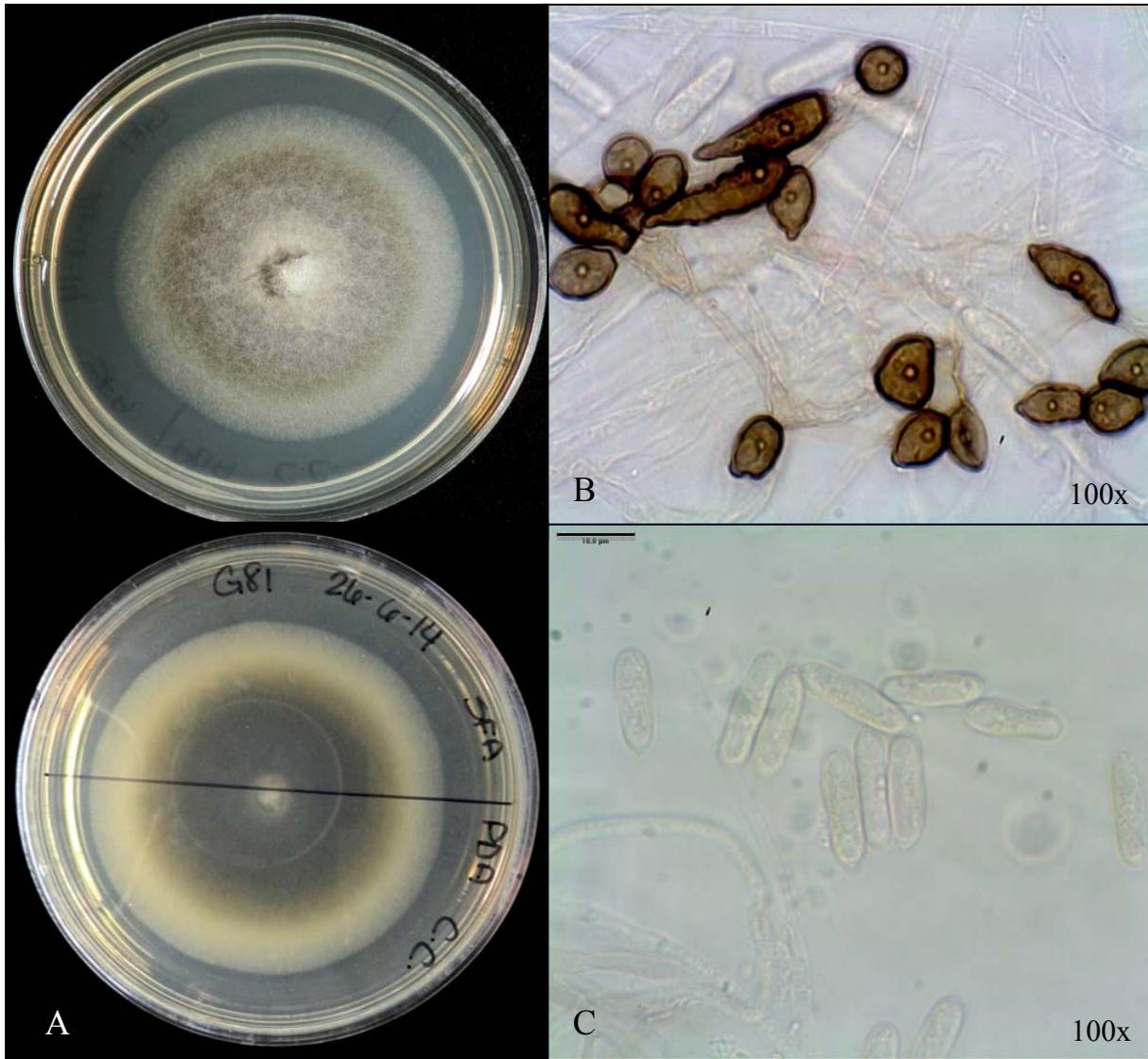
**Figura 28.** *Colletotrichum alatae* (F52251A) aislado de *Dioscorea alata* cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, margen entero. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



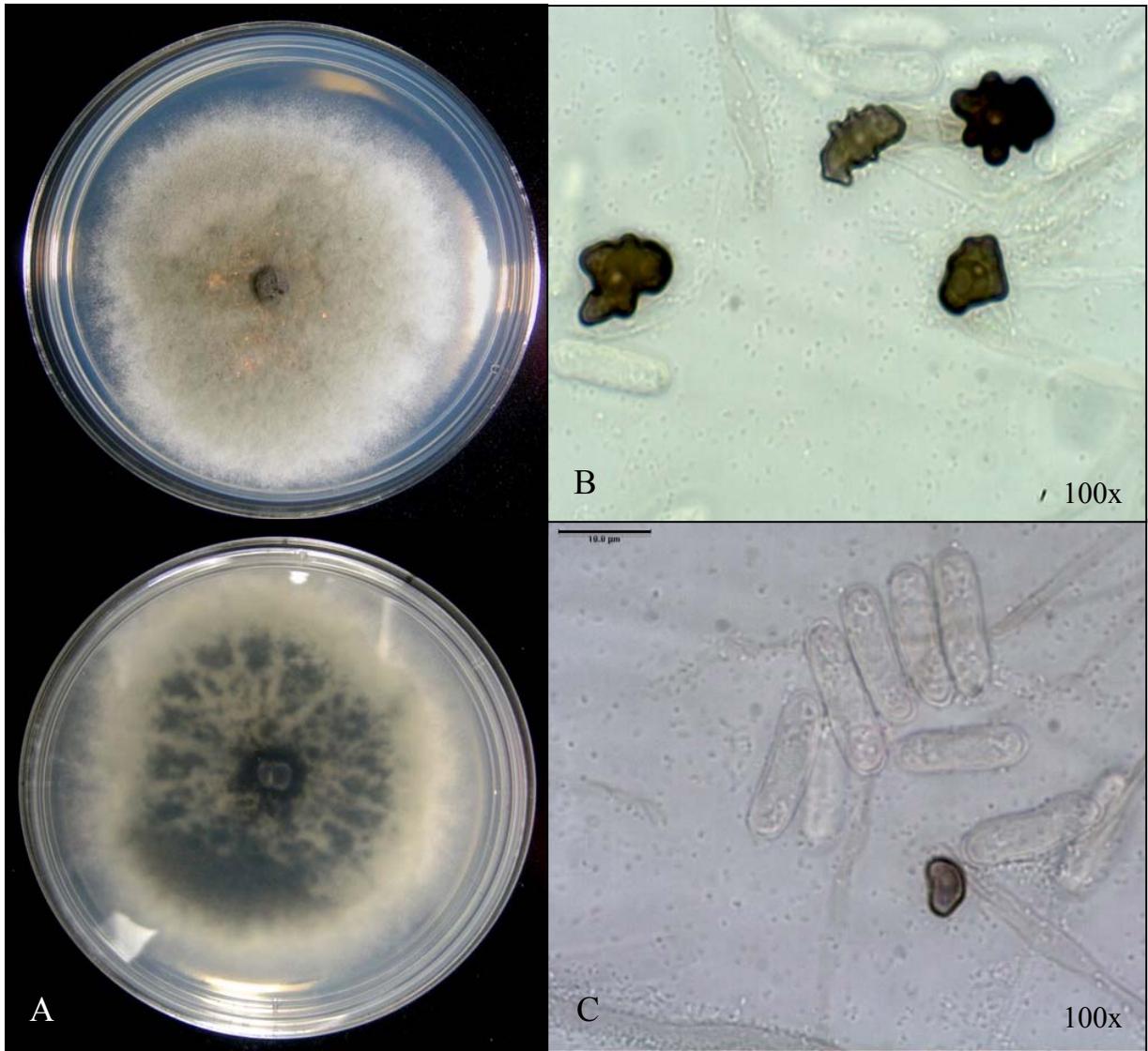
**Figura 29.** *Colletotrichum alatae* (F52253A) aislado de *Dioscorea alata* cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, margen entero. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



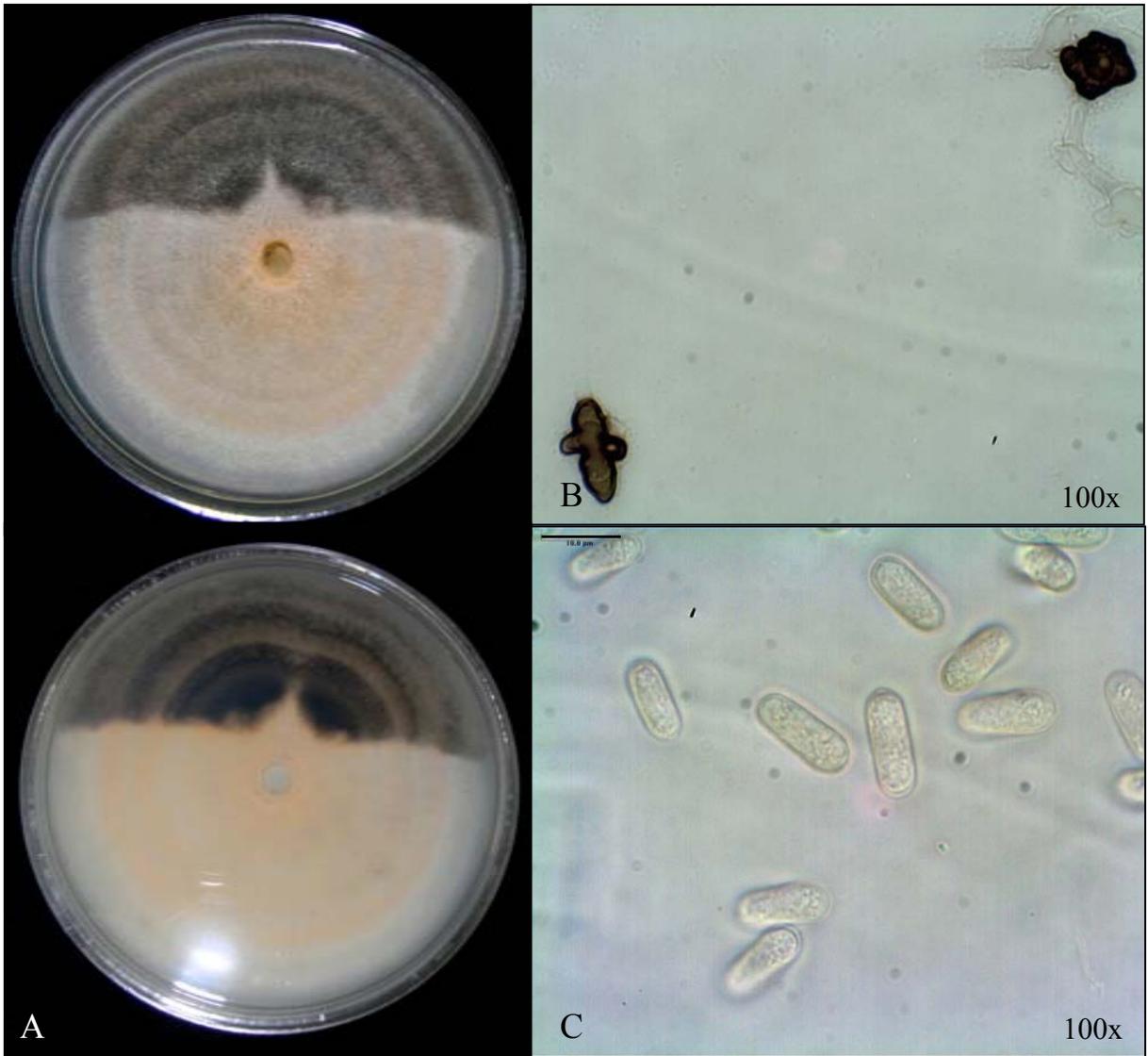
**Figura 30.** *Colletotrichum alatae* (F133251A) aislado de *Dioscorea alata* cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, margen entero. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



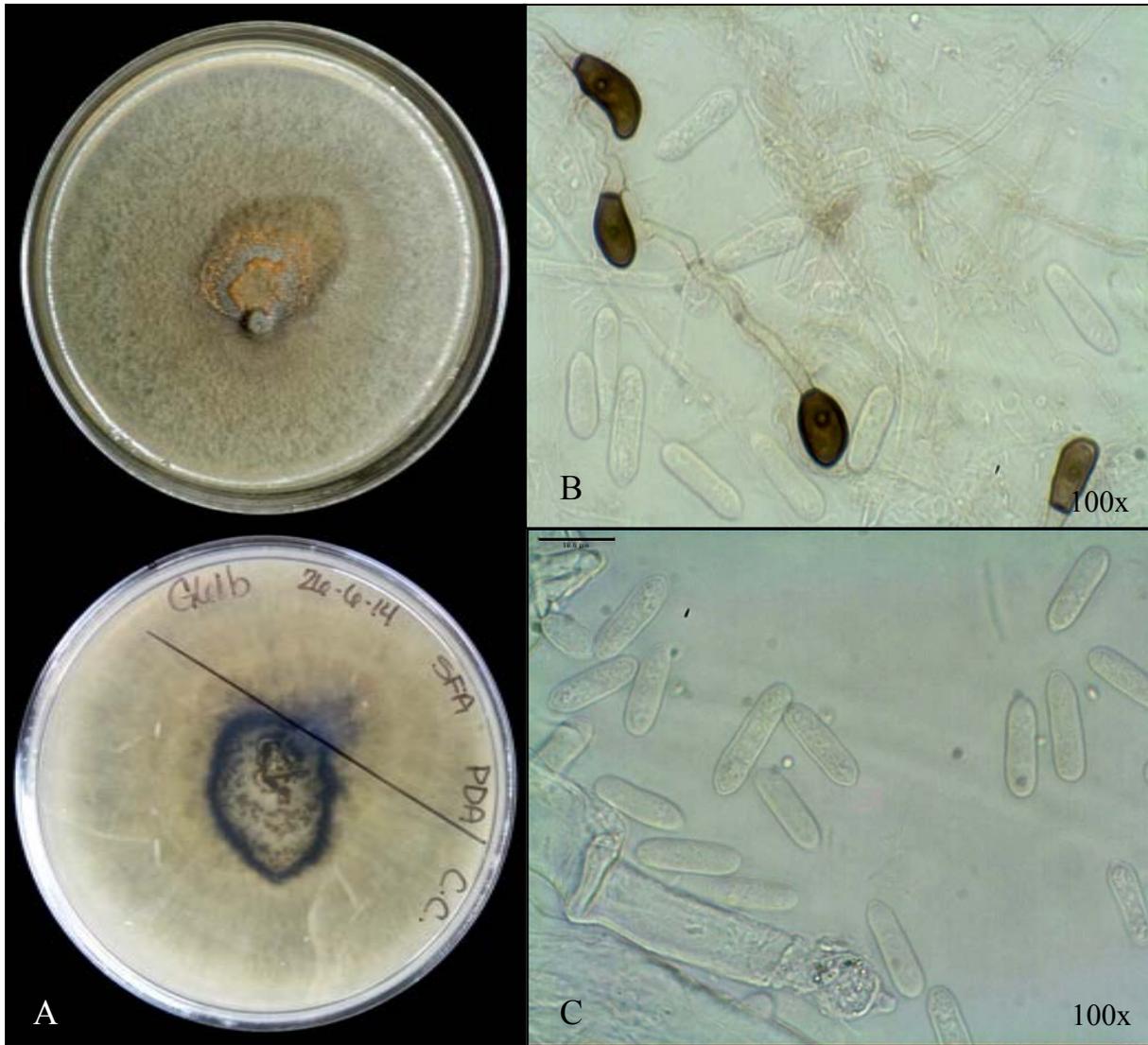
**Figura 31.** *Colletotrichum aotearoa* (G81) aislado de *Dioscorea alata* cv. Diamantes. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, margen irregular. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



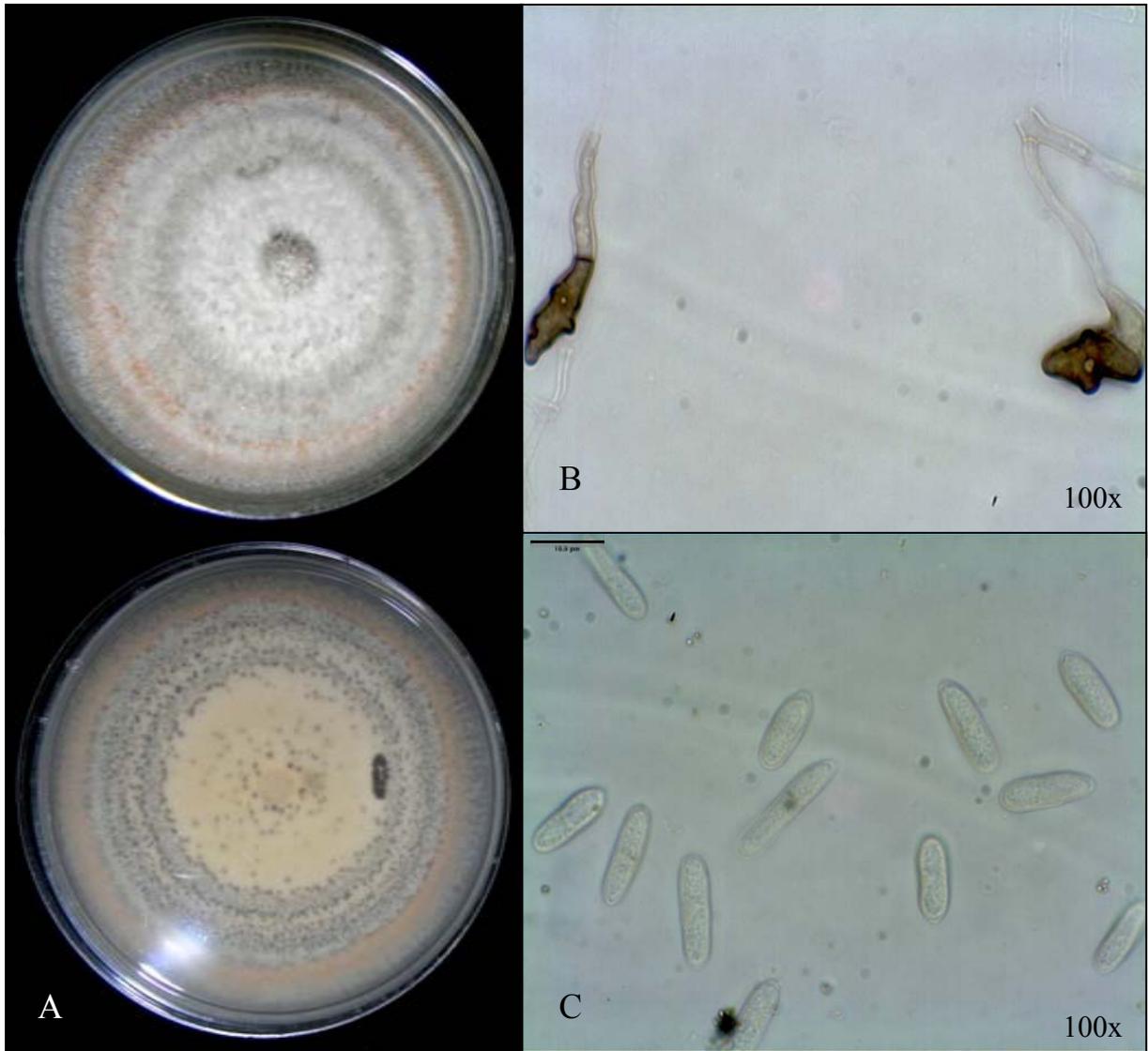
**Figura 32.** *Colletotrichum cliviae* (F85241C) aislado de *Dioscorea rotundata* cv. Guinea. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu\text{m}$ .



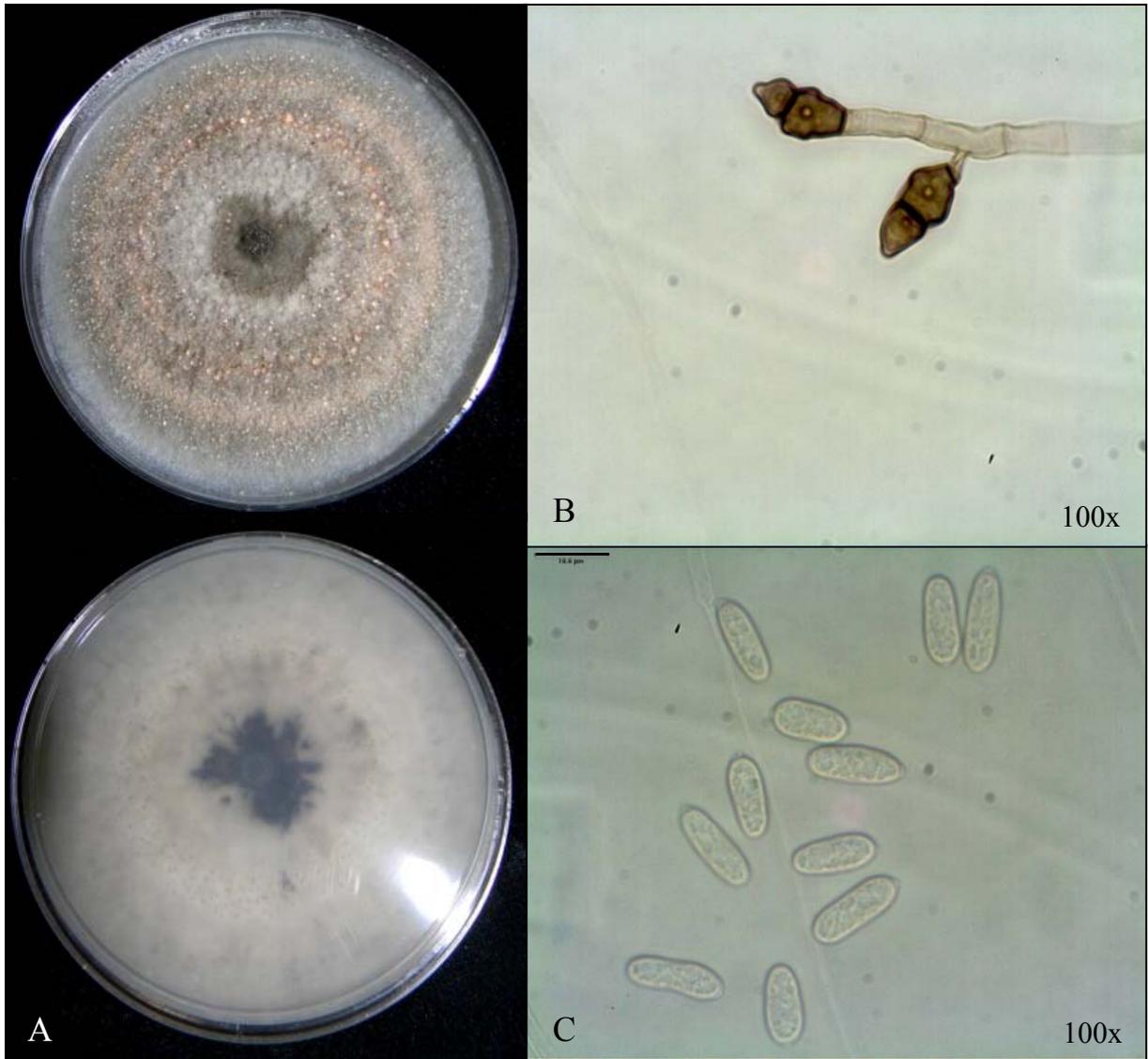
**Figura 33.** *Colletotrichum cliviae* (G14B) aislado de *Dioscorea alata* cv. PI 15587. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



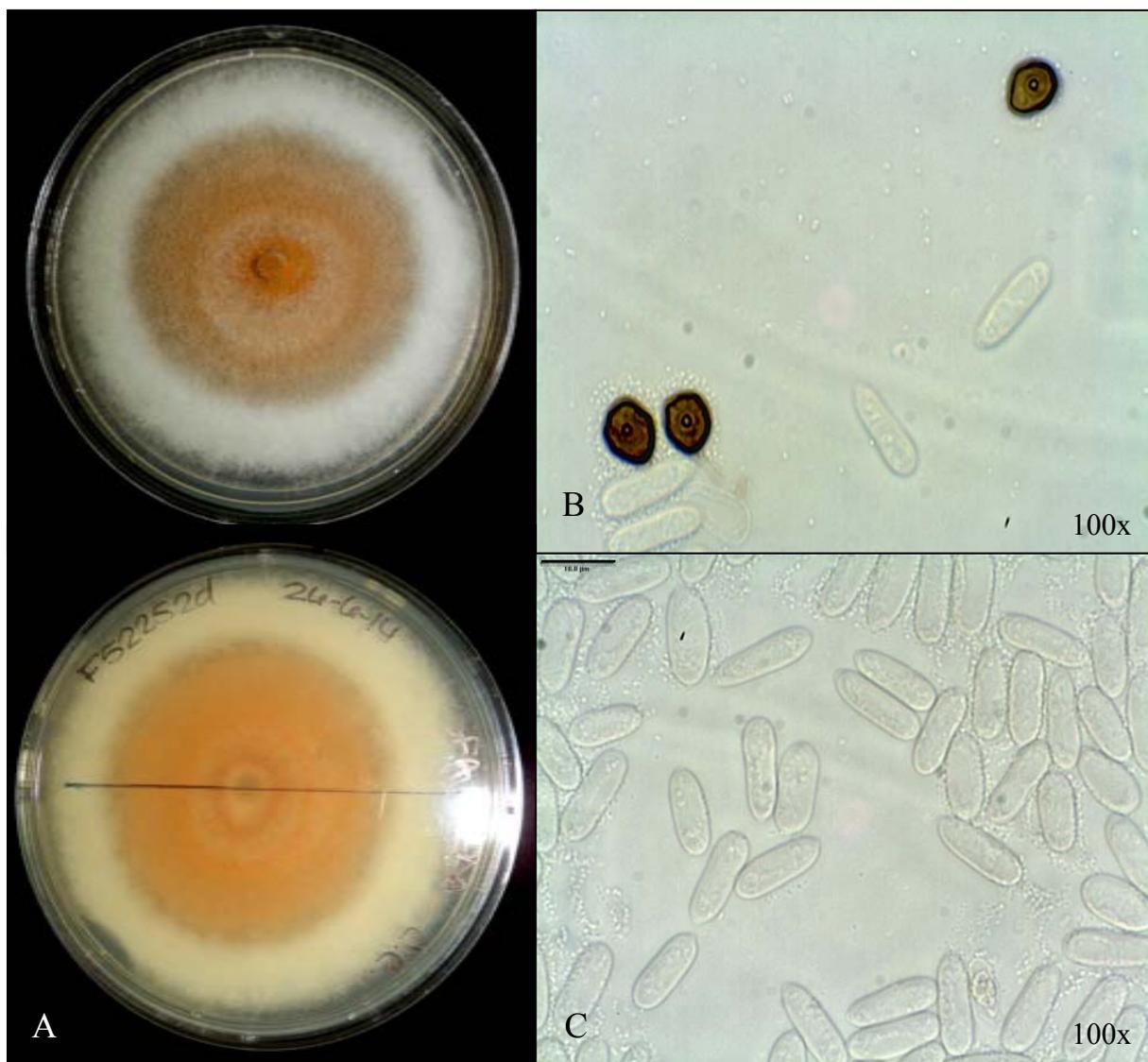
**Figura 34.** *Colletotrichum cliviae* (G61B) aislado de *Dioscorea alata* cv. Forastero. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m.



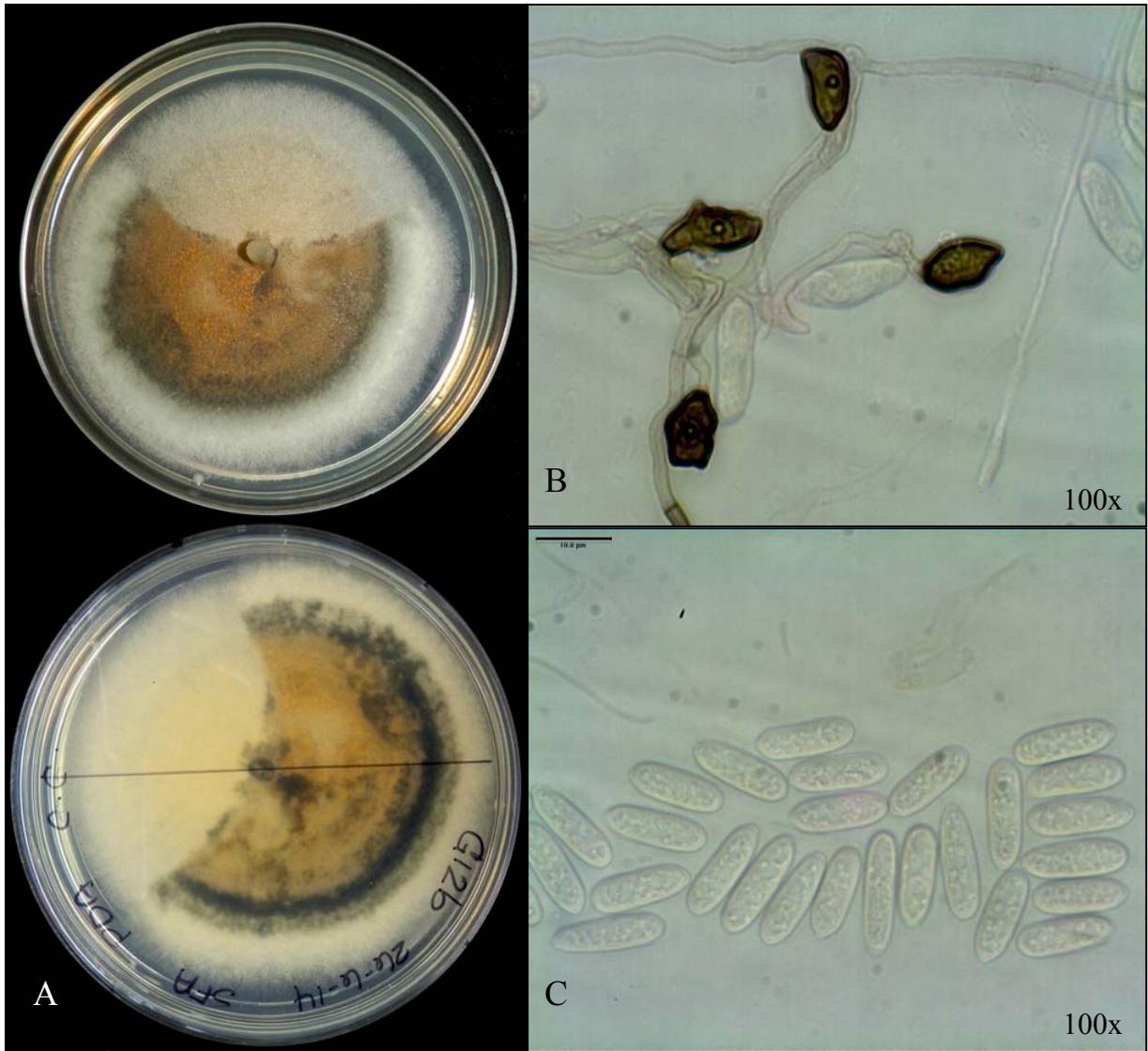
**Figura 35.** *Colletotrichum fructicola* (G23B) aislado de *Dioscorea. rotundata* cv. Colombiano. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



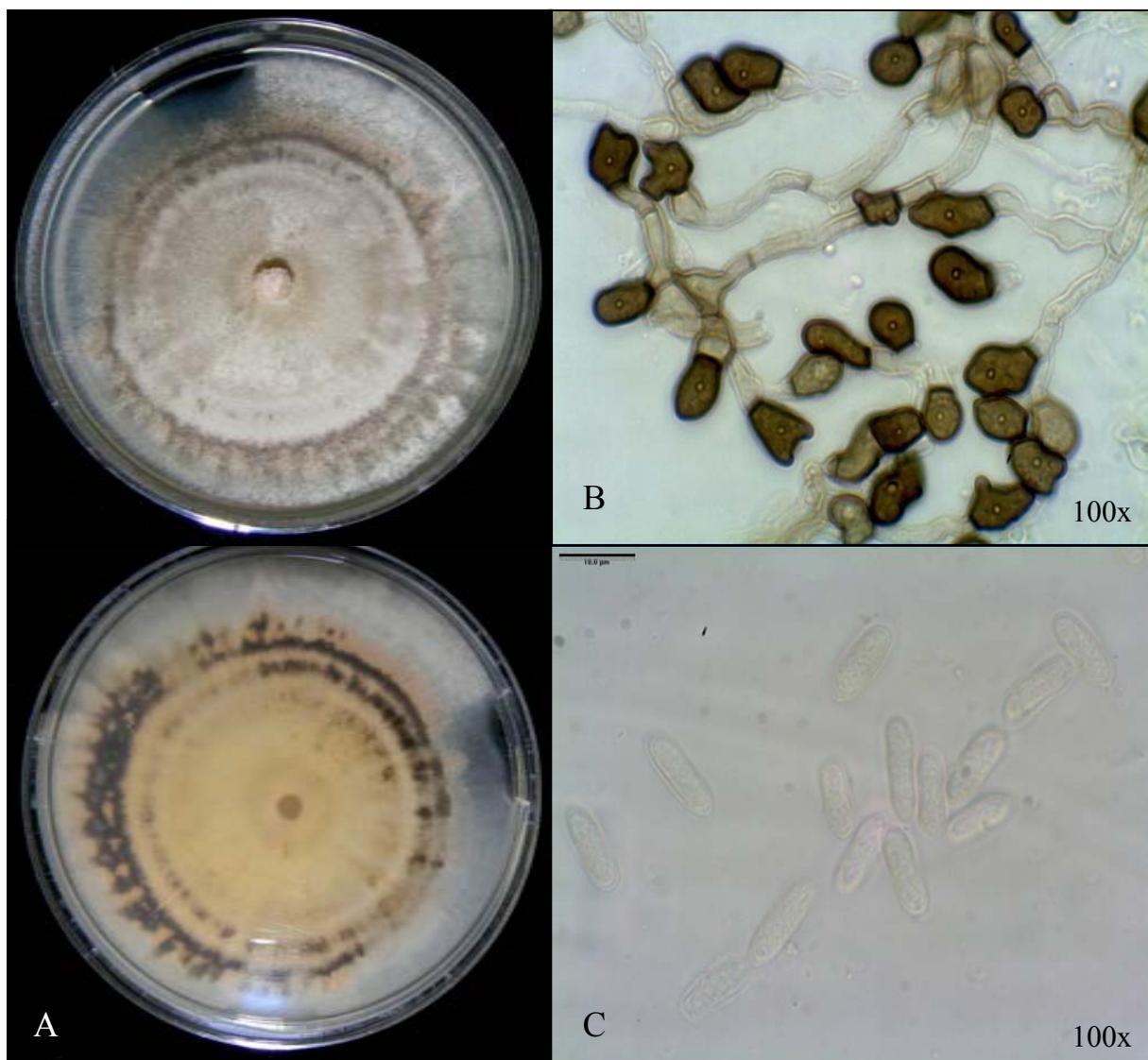
**Figura 36.** *Colletotrichum fruticola* (G62A) aislado de *Dioscorea alata* cv. Forastero. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



**Figura 37.** *Colletotricum gloeosporioides* (F52252D) aislado de *Dioscorea. alata* cv. Florido. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra = 10 µm.



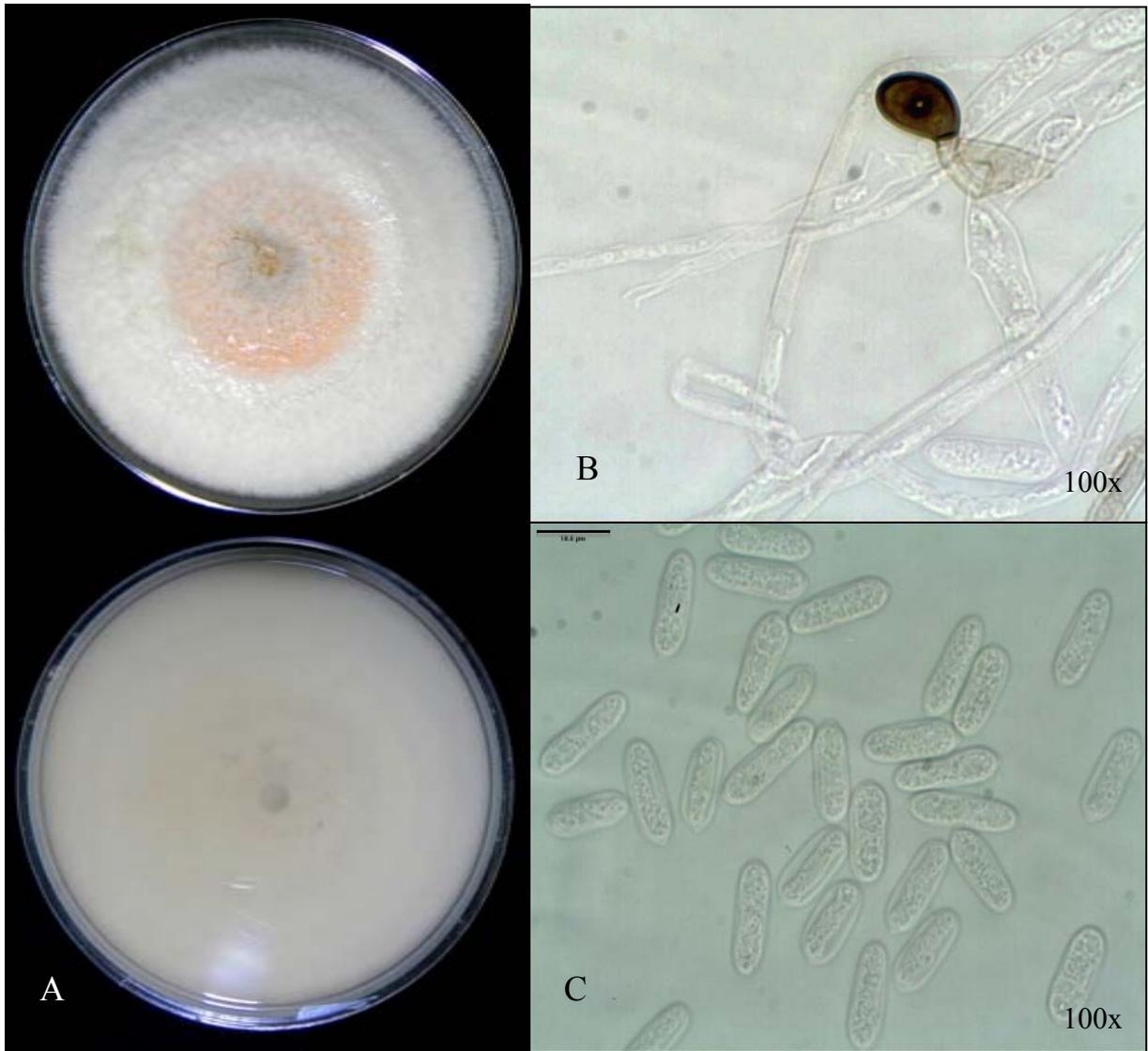
**Figura 38.** *Colletotrichum gloeosporioides* (G12B) aislado de *Dioscorea alata* cv. PI 15587. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



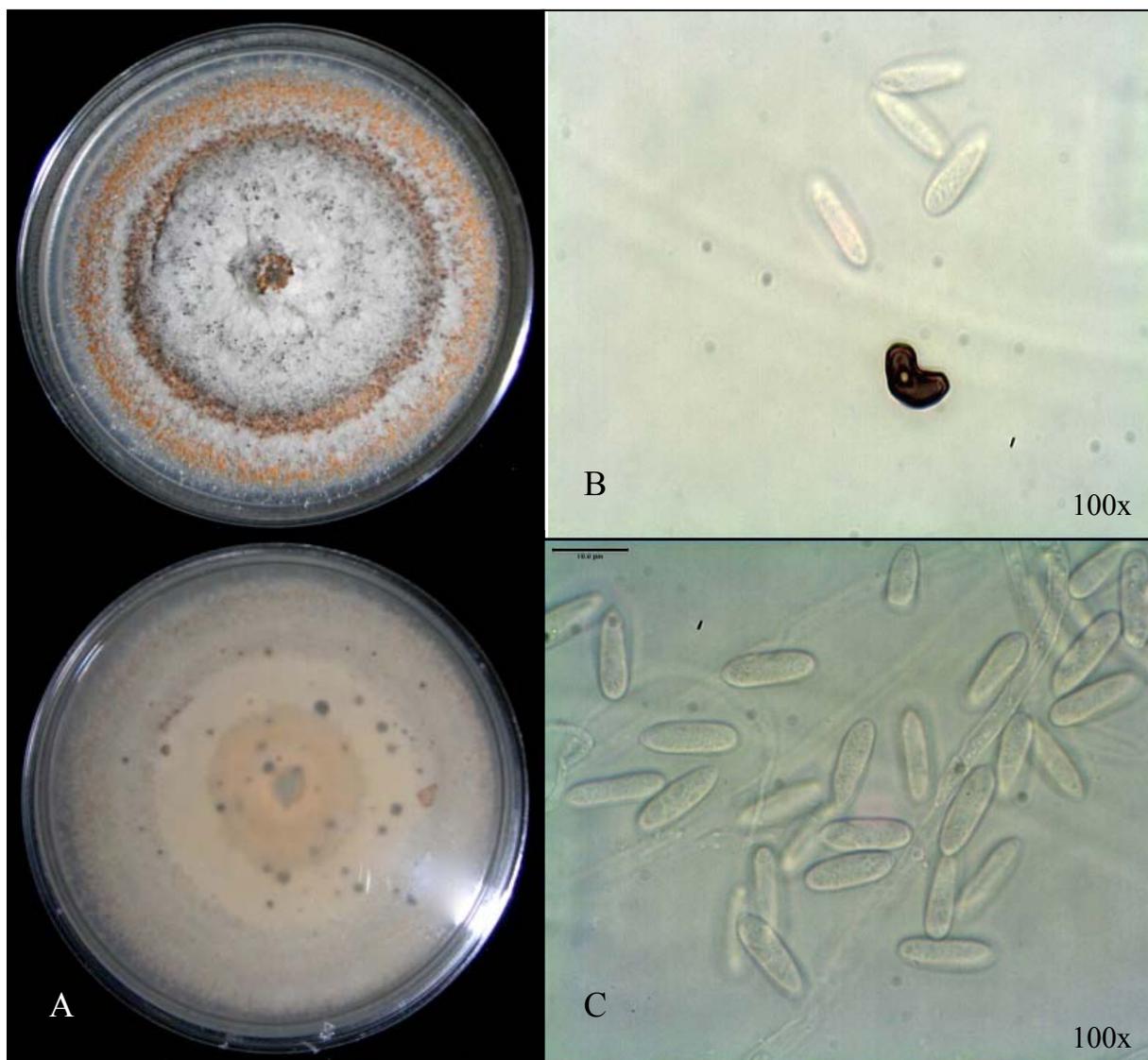
**Figura 39.** *Colletotrichum ignotum* (F11244B) aislado de *Dioscorea rotundata* cv. Guinea. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares o enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m.



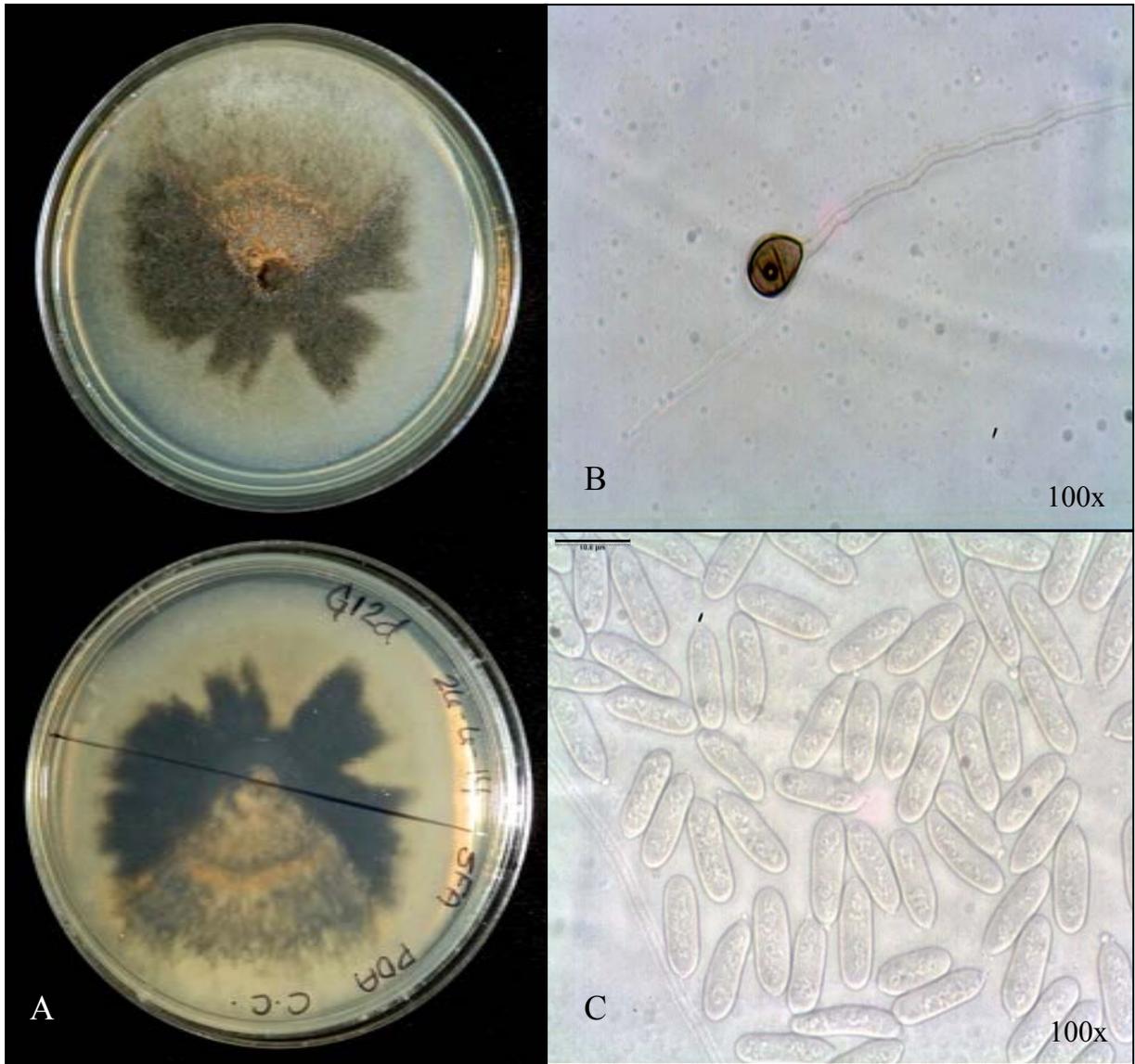
**Figura 40.** *Colletotrichum karstii* (G122A) aislado de *Dioscorea esculenta* cv. Muni. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



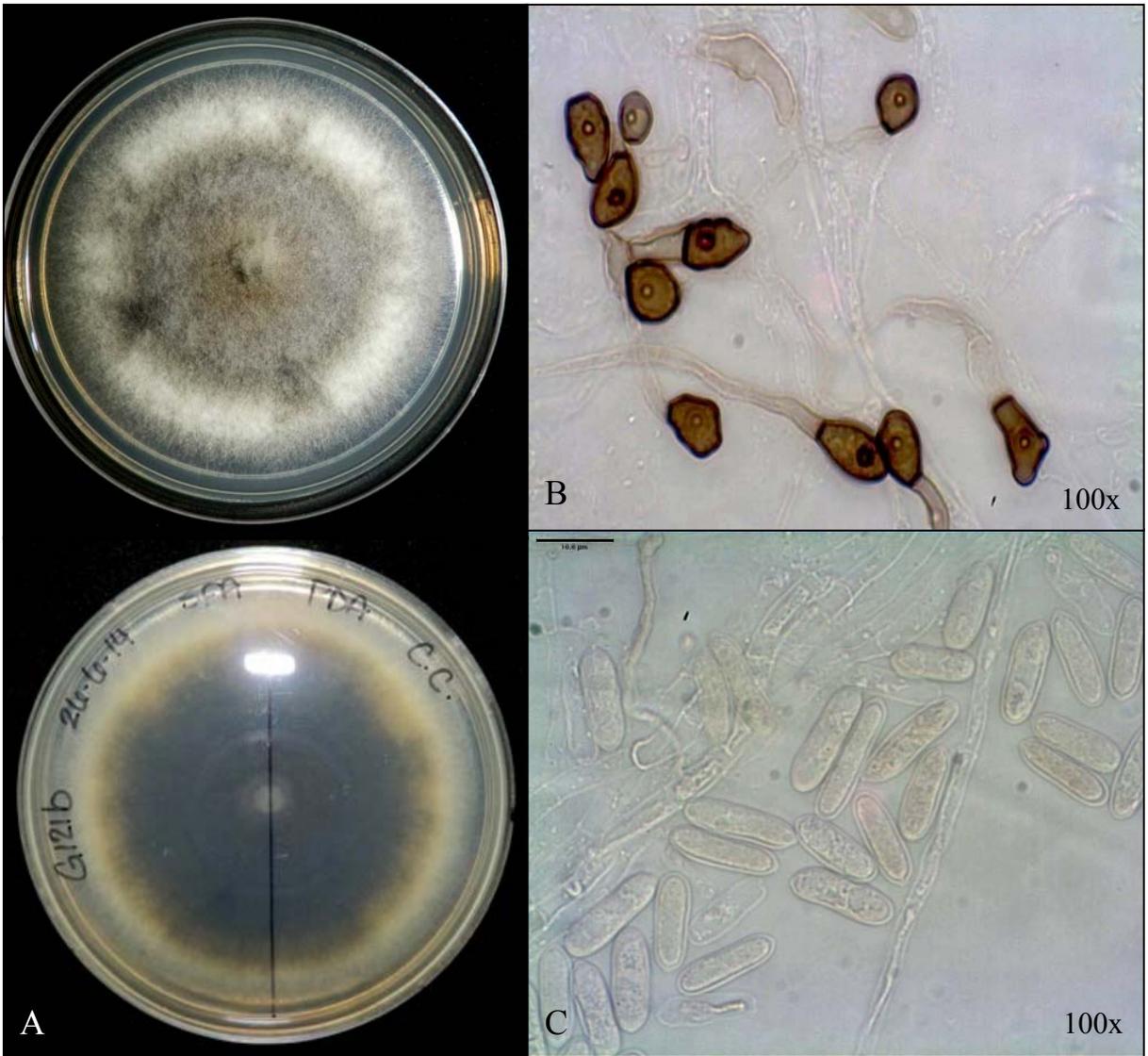
**Figura 41.** *Colletotrichum siamense* (F11244A) aislado de *Dioscorea rotundata* cv. Guinea. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



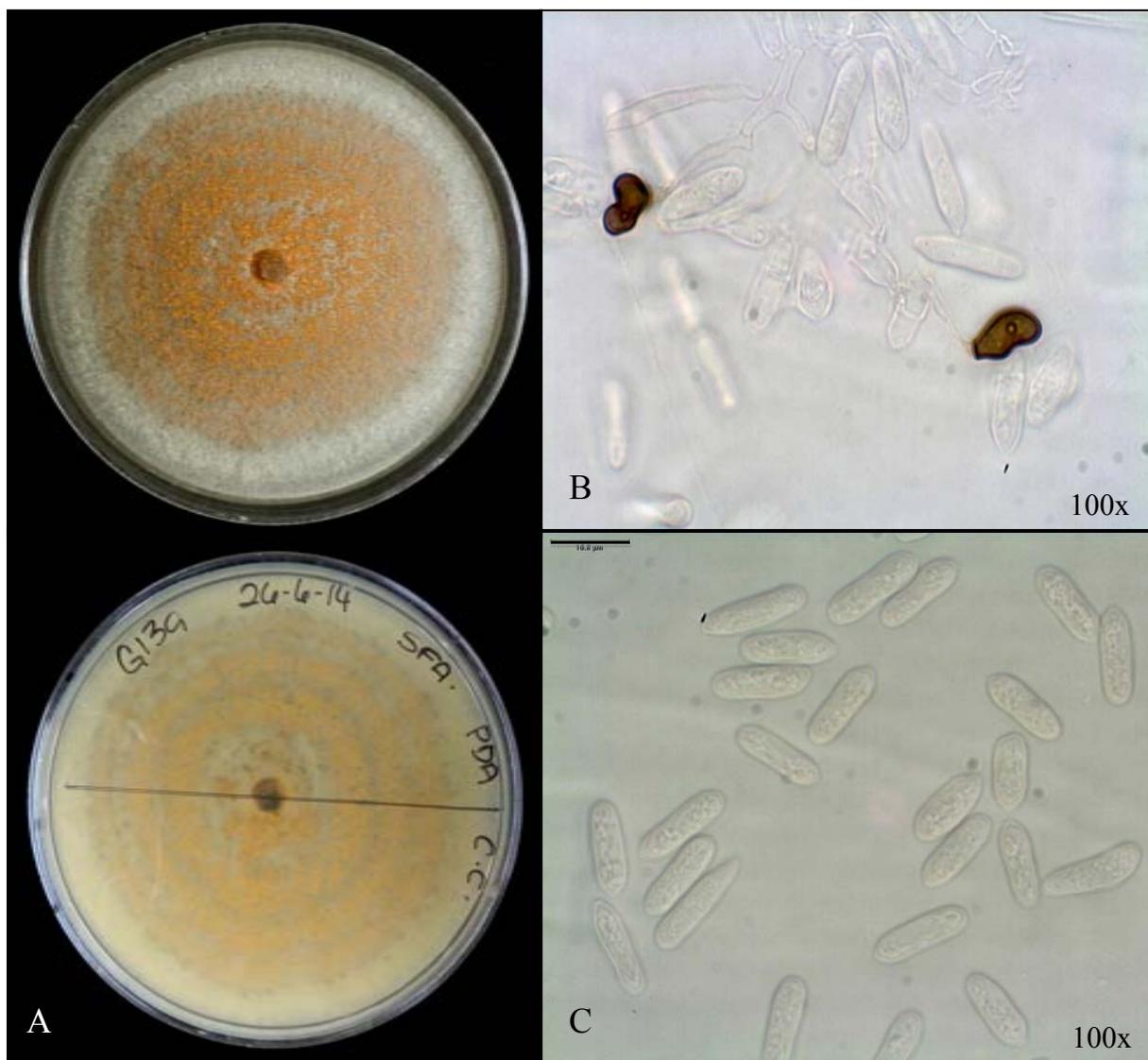
**Figura 42.** *Colletotrichum siamense* (G42B) aislado de *Dioscorea alata* cv. Del Monte. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apesorio claviforme, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10  $\mu$ m.



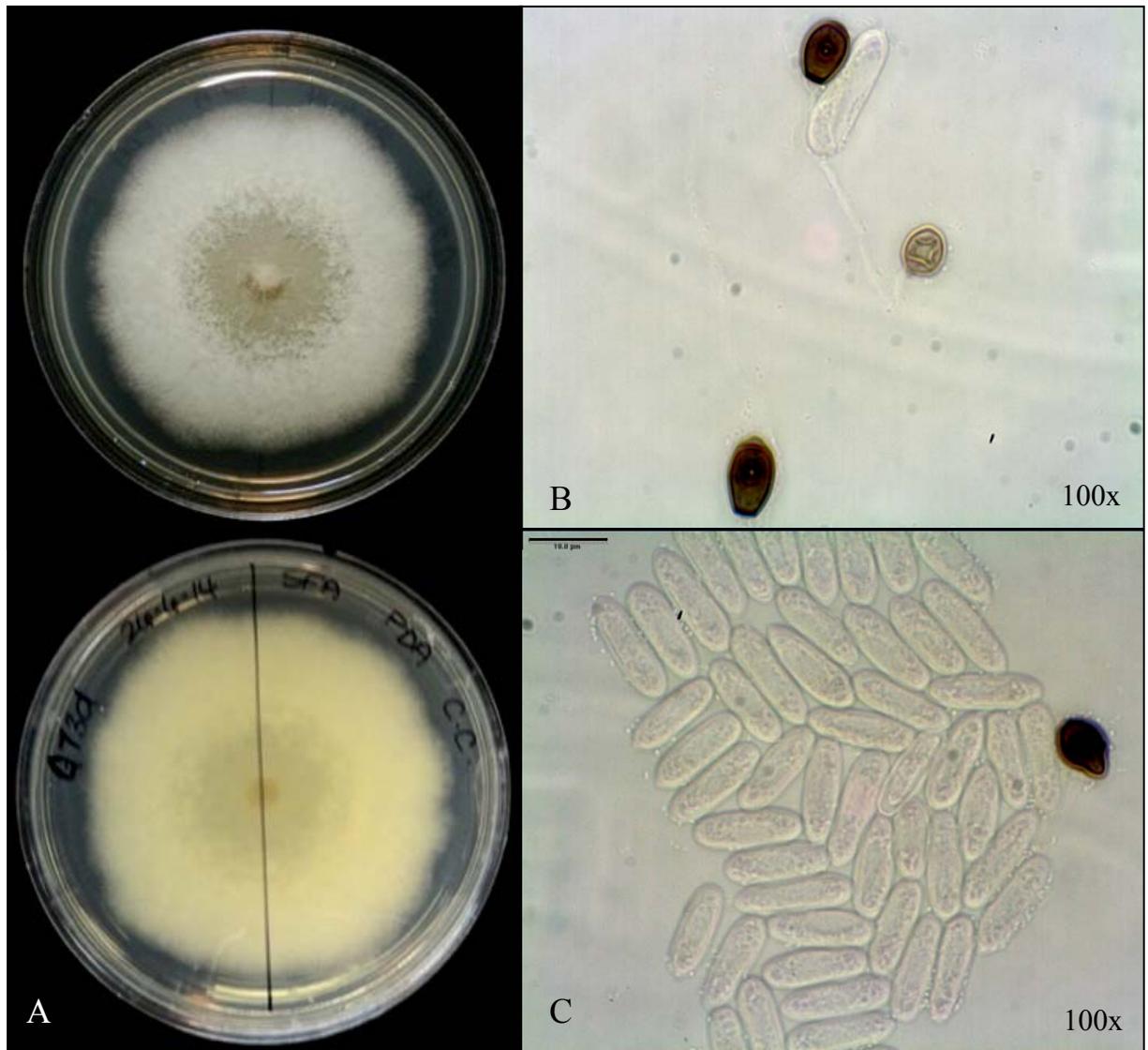
**Figura 43.** *Colletotrichum siamense* (G12D) aislado de *Dioscorea alata* cv. PI 15587. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



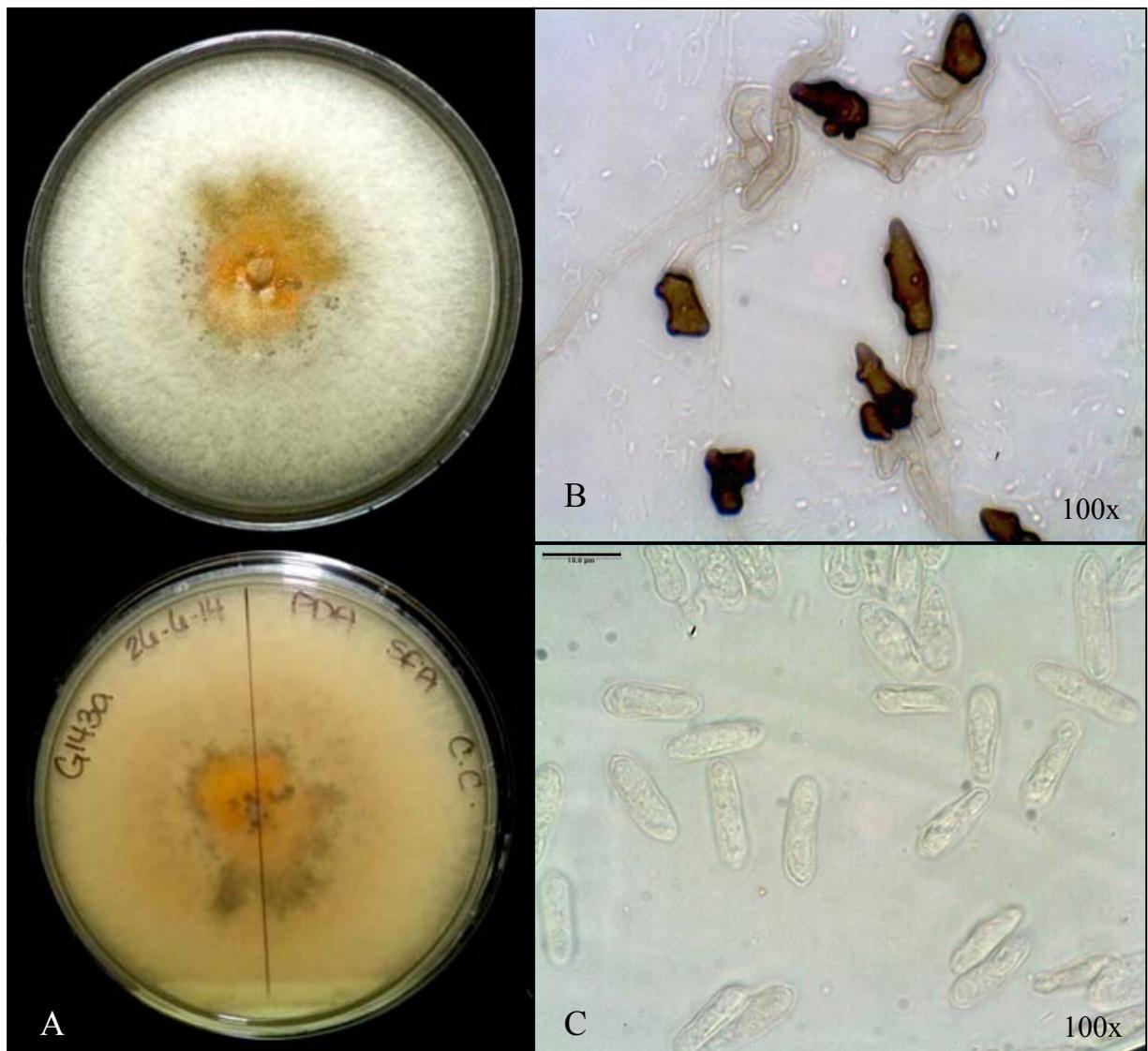
**Figura 44.** *Colletotrichum theobromicola* (G121B) aislado de *Dioscorea esculenta* cv. Muni. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



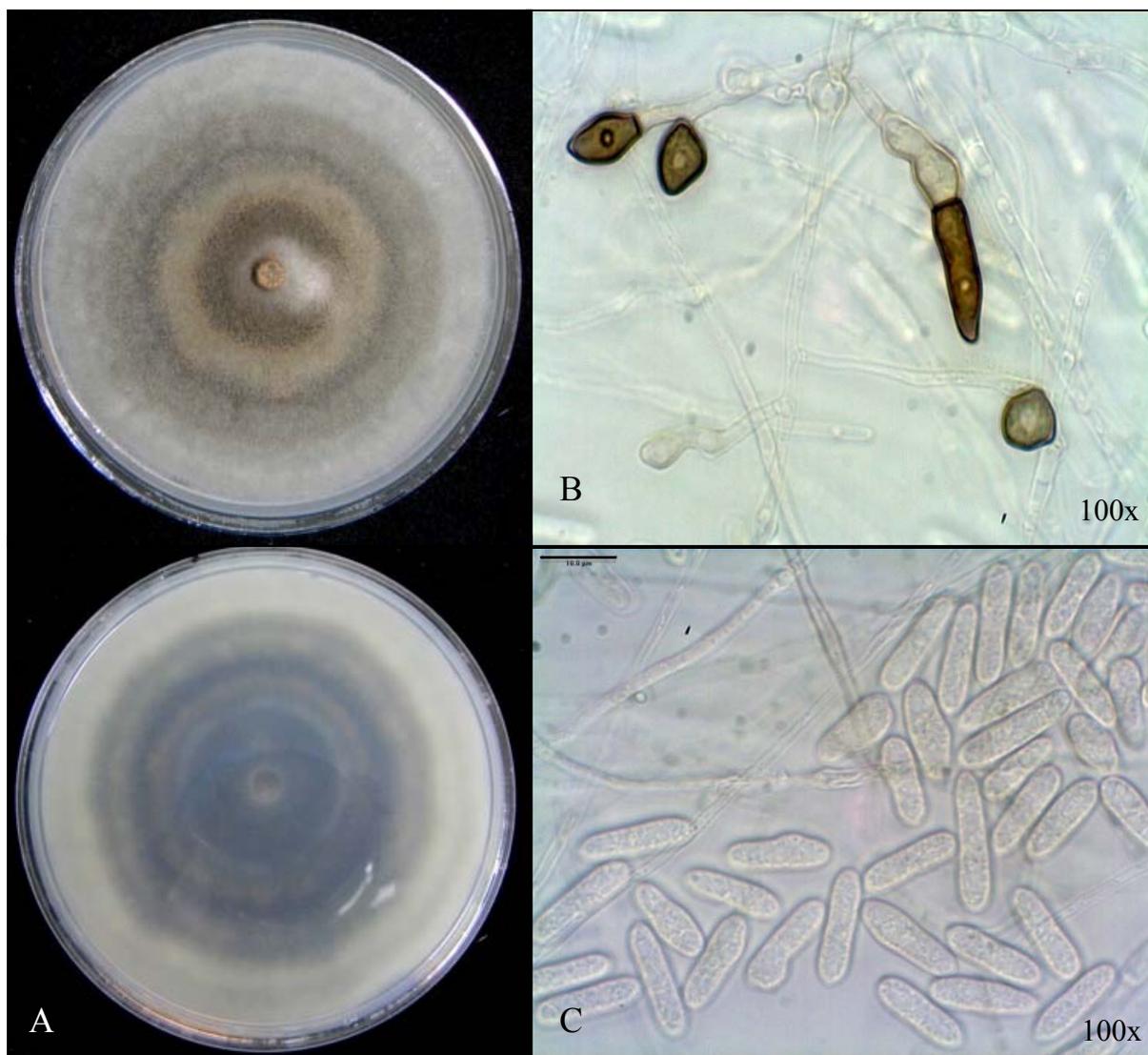
**Figura 45.** *Colletotrichum tropicale* (G13A) aislado de *Dioscorea alata* cv. PI 15587. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio ovoides, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 μm.



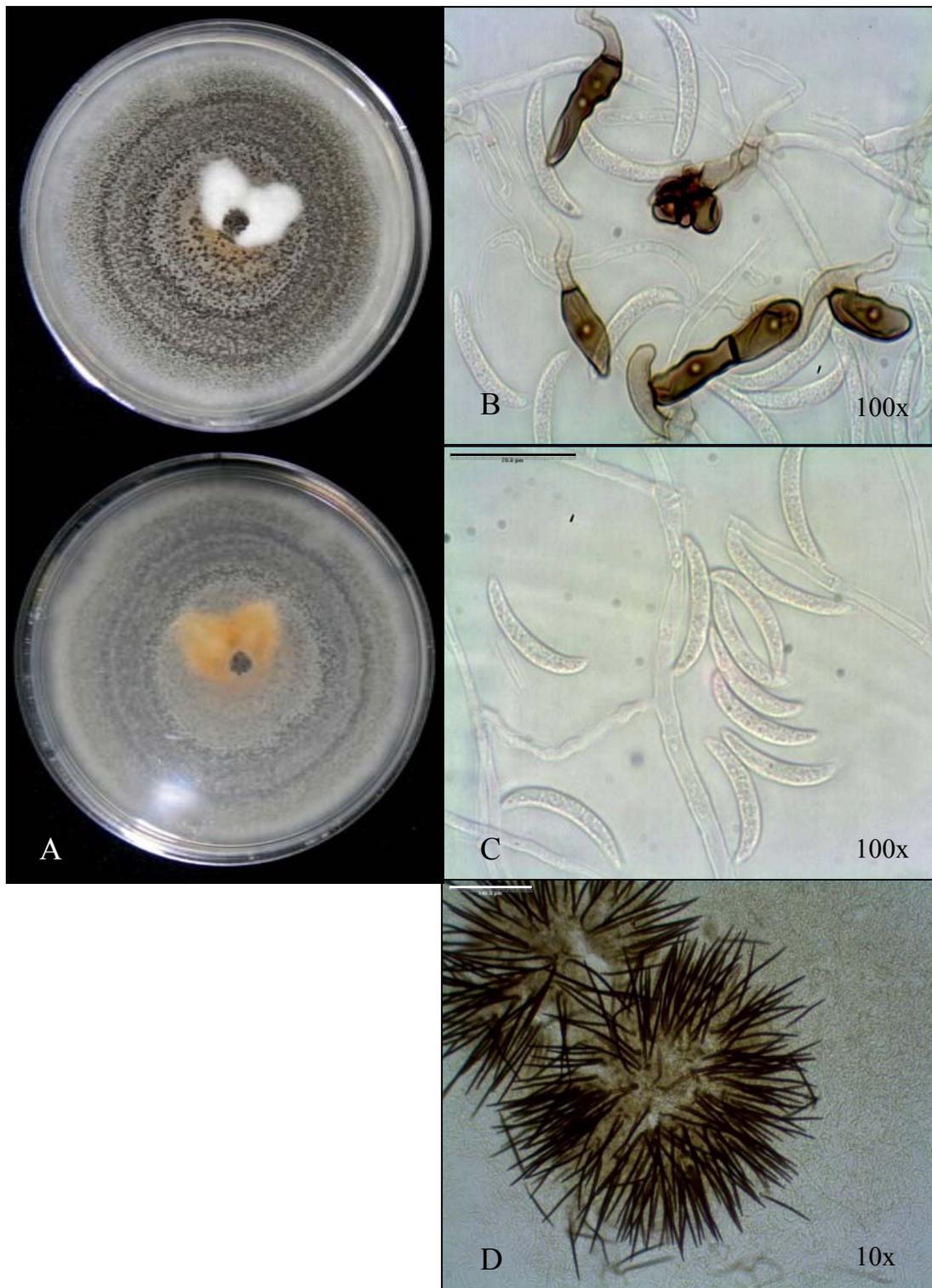
**Figura 46.** *Colletotrichum tropicale* (G73D) aislado de *Dioscorea alata* cv. Gunung. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio circular, márgenes enteros. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



**Figura 47.** *Colletotrichum tropicale* (G143A) aislado de *Dioscorea alata* cv. Purmay. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



**Figura 48.** *Colletotrichum tropicale* (G153A) aislado de *Dioscorea alata* cv. Kinabayo. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios ovoides, cilíndricos y ápices obtusos. Barra=10 µm.



**Figura 49.** *Colletotrichum truncatum* (F21182A) aislado de *Dioscorea rotundata* cv. Guinea Negro. (A) Colonia cultivada en medio PDA luego de 7 días. (B) Apresorio claviforme, márgenes irregulares. (C) Conidios fusiformes, alargados. Barra= 20  $\mu$ m (B-C). (D) Setas estériles, barra=140  $\mu$ m.

## **-Curvas de Crecimiento**

Las curvas de crecimiento de los aislados de *Colletotrichum* spp. mostraron diferentes patrones y medidas. Los aislados F133251A (*C. alatae*), F52253A (*C. alatae*) obtenidos de *D. alata* cv. Florido y F85241C (*C. cliviae*) de *D. rotundata* cv. Guinea, tuvieron una tasa de crecimiento menor en comparación a los demás aislados. De los aislados de *C. alatae*, el que mostró un menor crecimiento fue F133251A. Éste no se mostró significativamente diferente del aislado F52253A (*C. alatae*), pero sí del aislado F52251A (*C. alatae*). El aislado F52251A (*C. alatae*) tuvo un crecimiento mayor que los otros aislados de *C. alatae* (F133251A y F52253A) estudiados, lo cual difiere del rango de medidas descritas anteriormente para esta especie. El aislado F52253A (*C. alatae*), no fue significativamente diferente de los aislados G81 (*C. aoteora*) de *D. alata* cv. Diamantes, G73D (*C. tropicale*) de *D. alata* cv. Gunung y F52251A (*C. alatae*) de *D. alata* cv. Florido. El aislado de *C. tropicale* (G73D) mostró un crecimiento diferente de los otros aislados de *C. tropicale* (G153A *D. alata* cv. Kinabayo, G143A *D. alata* cv. Purmay y G13A *D. alata* cv. PI 15587). Los aislados G81 (*C. aoteora*), G73D y G153A (*C. tropicale*), F52251A (*C. alatae*), G122A (*C. karstii*), F21182A (*C. truncatum*) y G12B (*C. gloeosporioides*), presentaron un crecimiento de 49.0 a 74.5 mm, crecimiento intermedio comparado con los demás aislados. El 55% de los aislados tuvieron un crecimiento mayor de 75.5 mm y no hubo diferencias significativas ( $p$  valor  $> 0.05$ ) entre estos (Tabla 11). La mayoría de estos aislados no mostraron más de 4mm a las 24 horas y estos crecieron aproximadamente de diez a 15 mm por día (Figura 50-52).

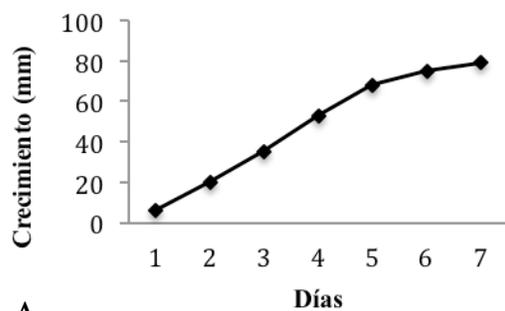
**Tabla 11.** Promedio del crecimiento (mm) entre los aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de manchas foliares de *Dioscorea* spp.

<b>No. De Aislado y Especie</b>	<b>Promedio (mm)</b>
<b>F133251A<sup>1</sup> (<i>C. alatae</i>)</b>	35.5 a <sup>2</sup>
<b>F85241C (<i>C. cliviae</i>)</b>	44.0 a
<b>F52253A (<i>C. alatae</i>)</b>	49.0 ab
<b>G81<sup>3</sup> (<i>C. aoteora</i>)</b>	59.5 bc
<b>G73D (<i>C. tropicale</i>)</b>	60.0 bc
<b>F52251A (<i>C. alatae</i>)</b>	60.5 bcd
<b>G122A (<i>C. karstii</i>)</b>	67.0 cde
<b>F21182A (<i>C. truncatum</i>)</b>	72.0 cde
<b>G12B (<i>C. gloeosporioides</i>)</b>	73.5 cde
<b>G153A (<i>C. tropicale</i>)</b>	74.5 de
<b>F11244B (<i>C. ignotum</i>)</b>	75.5 e
<b>G121B (<i>C. theobromicola</i>)</b>	76.5 e
<b>F52252D (<i>C. gloeosporioides</i>)</b>	76.5 e
<b>G14B (<i>C. cliviae</i>)</b>	77.0 e
<b>G12D (<i>C. siamense</i>)</b>	77.5 e
<b>G143A (<i>C. tropicale</i>)</b>	79.0 e
<b>G61B (<i>C. cliviae</i>)</b>	79.0 e
<b>G42B (<i>C. siamense</i>)</b>	79.5 e
<b>G23B (<i>C. fructicola</i>)</b>	79.5 e
<b>G13A (<i>C. tropicale</i>)</b>	79.5 e
<b>F11244A (<i>C. siamense</i>)</b>	80.0 e
<b>G62A (<i>C. fructicola</i>)</b>	80.0 e

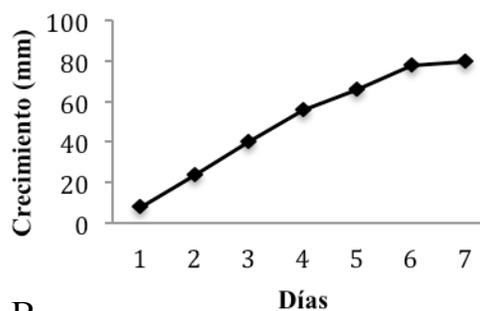
<sup>1</sup> F= se refiere a fincas privadas.

<sup>2</sup> Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

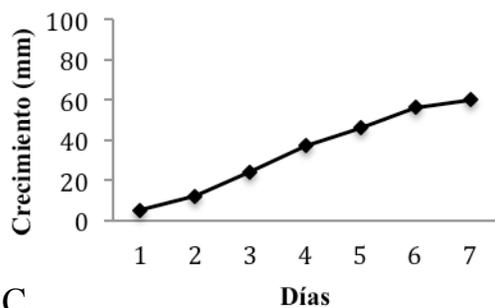
<sup>3</sup> G= se refiere a colección de germoplasma ubicada en predios de UPRM en Corozal, Puerto Rico.



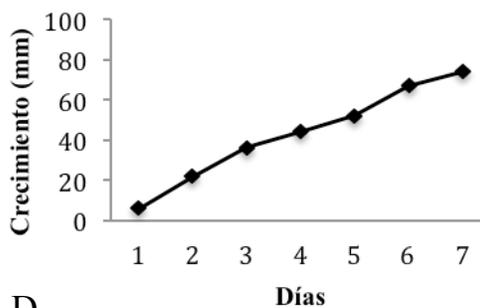
A



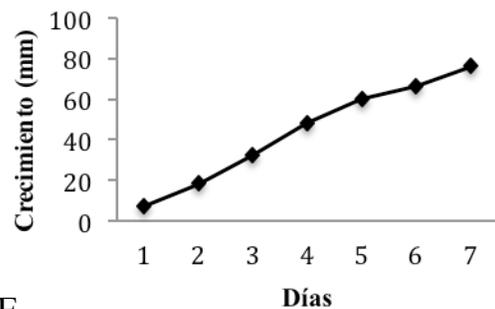
B



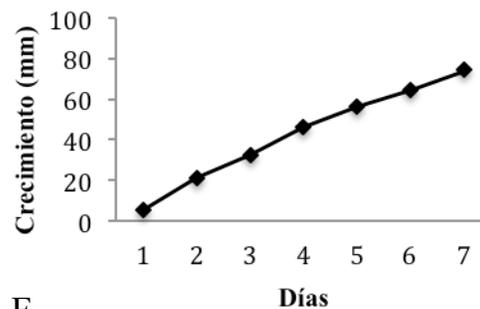
C



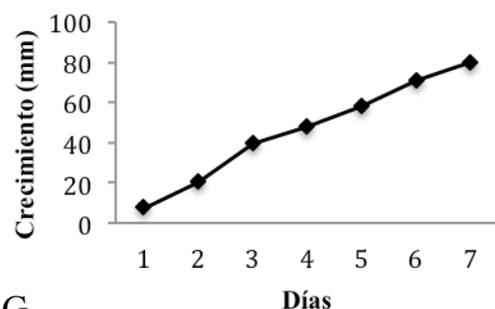
D



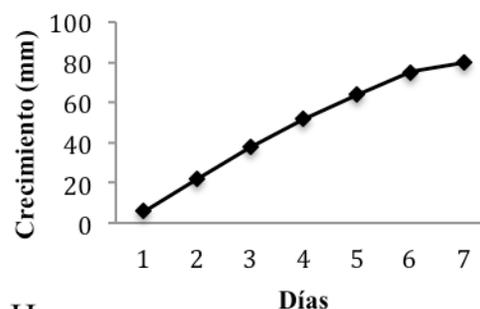
E



F

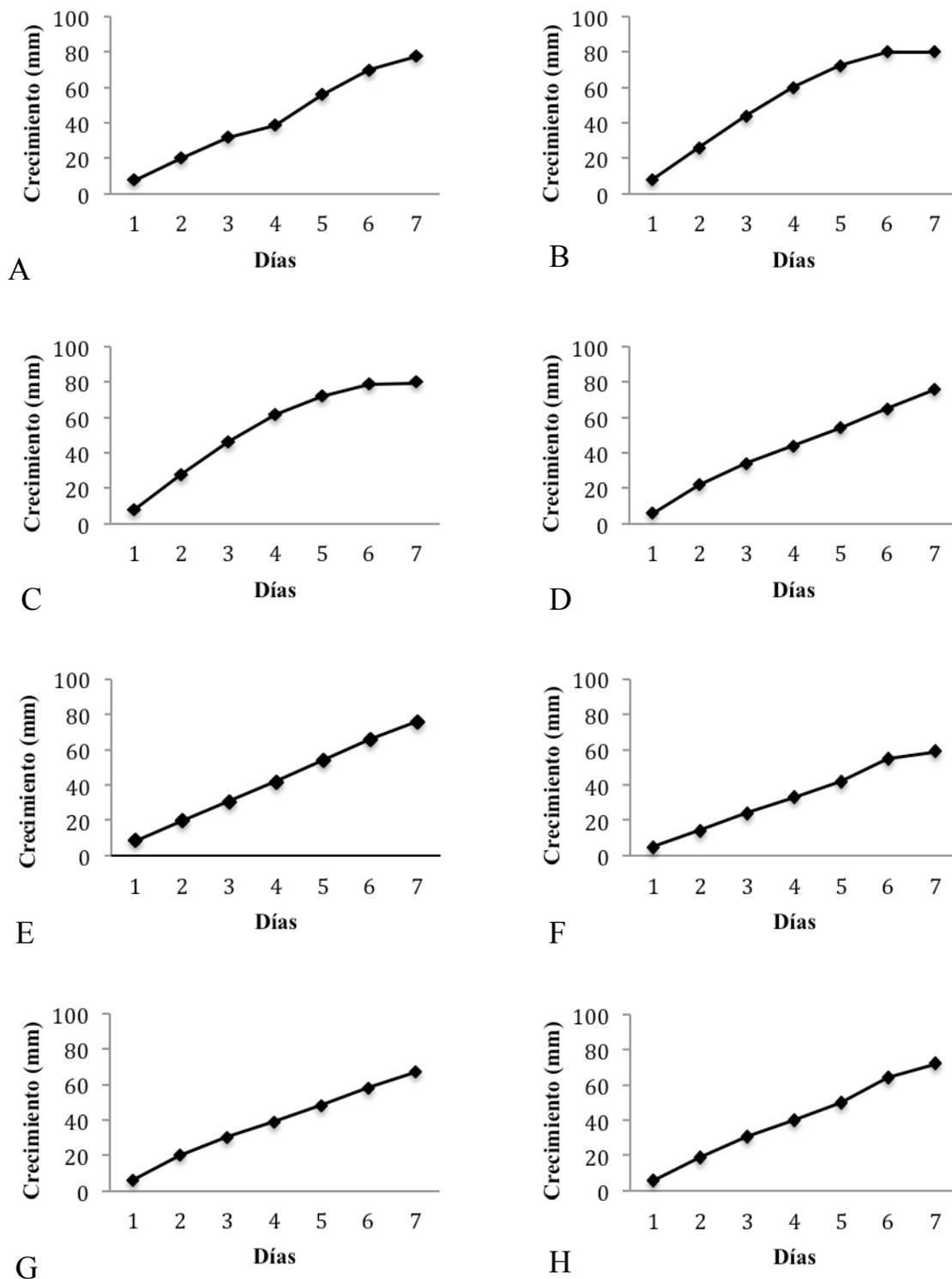


G

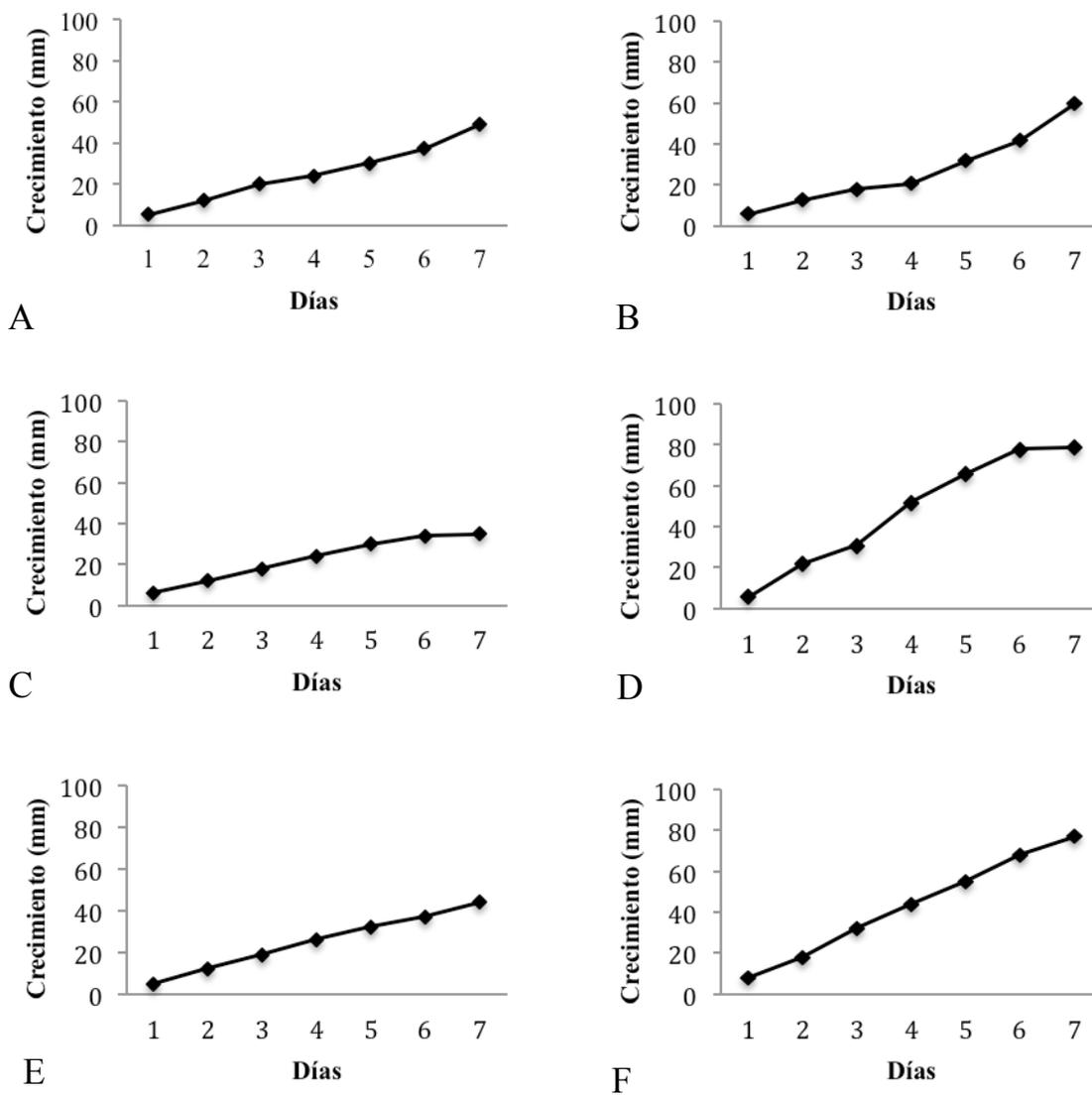


H

**Figura 50.** Curvas de crecimiento de *Colletotrichum tropicalis* en PDA a 28°C ([A] G143A, [B] G13A, [C] G73D y [D] G153A), *C. gloeosporioides* ([E] F52252D y [F] G12B) y *C. fructicola* ([G] G23B y [H] G62A).



**Figura 51.** Curvas de crecimiento de *Colletotrichum siamense* en PDA a 28°C ([A] G12D, [B] F11244A y [C] G42B), *C. ignotum* ([D] F11244B), *C. theobromicola* ([E] G121B), *C. aoteora* ([F] G81), *C. karstii* ([G] G122A) y *C. truncatum* ([H] F21182A).



**Figura 52.** Curvas de crecimiento de *Colletotrichum alatae* en PDA a 28°C ([A] F52253A, [B] F52251A y [C] F133251A), *C. cliviae* ([D] G61B, [E] F85241C y [F] G14B).

### Pruebas de patogenicidad de aislados de *Colletotrichum* spp.

Noventa y cinco por ciento (21/22) evaluados fueron patogénicos a *Dioscorea* spp. Estos fueron patogénicos en pruebas realizadas con herida en el tejido foliar. Diez de ellos fueron también patogénicos en pruebas sin herida en el tejido foliar (Tabla 12). Los aislados de *C. tropicale* (G13A, G143A, G73D y G153A) presentaron diferentes niveles de severidad, algunos mostraron ser patogénicos con herida y otros, con herida y sin herida. Los fueron patogénicos con herida y sin herida, con una severidad mayor de 21%. Los aislados de *C. siamense* (G12D, F11244A y G42B) mostraron ser patogénicos con niveles de severidad 1 ( $\leq 20\%$ ) y 2 (21-40%), en pruebas con herida y sin herida. El aislado (F11244A) mostró ser patogénico con y sin herida en el tejido, y con severidad entre 21 a 40%. *C. gloeosporioides* (G12B y F52252D) al igual que *C. siamense* mostró ser patogénico con severidad en los niveles 1 y 2. El aislado G12B con nivel de severidad 1 ( $\leq 20\%$ ) fue patogénico con y sin herida, mientras que el aislado F52252D solamente con herida en el tejido. Dos de los aislados de *C. cliviae* (G14B y F85241C) fueron patogénicos solo con herida en el tejido y con un nivel de severidad 2 (21-40%). El aislado de *C. cliviae* (G61B) fue patogénico con y sin herida, con un nivel de severidad 1 ( $\leq 20\%$ ). Los aislados de *C. alatae* (F52253A, F133251A y F52251A) también mostraron tener diferentes niveles de severidad. El aislado F133251A mostró un nivel de severidad 1 ( $\leq 20\%$ ) y F52253A un nivel 3 ( $\geq 41\%$ ), siendo patogénicos solo con herida en el tejido. El aislado F52251A fue patogénico con un nivel de severidad 2 (21-40%) con y sin herida en el tejido. Los aislados de *C. fructicola* (G62A y G23B) fueron más virulentos con un nivel de severidad 3 ( $\geq 41\%$ ). El aislado G62A fue patogénico con y sin herida, mientras que el aislado G23B lo fue solo con herida en el tejido. Los síntomas comenzaron a aparecer luego de cinco a doce días de incubación. Estos síntomas fueron manchas color marrón rojizo con bordes cloróticos, necrosis severa, clorosis en la venación de

las hojas y manchas negras (Figura 53-56). Los controles no mostraron ningún tipo de síntoma. Los aislados menos virulentos fueron G73D, G12B,G12D, F133251A, G81 y G61B, restringiéndose al área alrededor de la herida. Por otro lado, los más virulentos fueron G143A, G121B, G62A, F52253A y G23B.

**Tabla 12.** Resultados de las pruebas de patogenicidad *in vitro* en los diferentes aislados de *Colletotrichum spp.* en tejido foliar de *Dioscorea spp.*

Especie de <i>Colletotrichum spp.</i>	Aislado	Nivel de severidad <sup>1</sup>	Tratamientos	
			Con herida	Sin herida
<i>C. alatae</i>	F133251A <sup>2</sup>	1	+	-
	F52251A	2	+	+
	F52253A	3	+	-
<i>C. aoteora</i>	G81 <sup>3</sup>	1	+	+
	G61B	1	+	+
<i>C. cliviae</i>	G14B	2	+	-
	F85241C	2	+	-
	G62A	3	+	+
<i>C. fructicola</i>	G23B	3	+	+
	G12B	1	+	+
<i>C. gloeosporioides</i>	F52252D	2	+	-
	F11244B	2	+	+
<i>C. ignotum</i>	F11244B	2	+	+
<i>C. karstii</i>	G122A <sup>4</sup>	0	-	-
<i>C. siamense</i>	G12D	1	+	-
	F11244A	2	+	+
	G42B	2	+	-
<i>C. theobromicola</i>	G121B	3	+	+
	G73D <sup>3</sup>	1	+ <sup>5</sup>	- <sup>6</sup>
<i>C. tropicale</i>	G153A	2	+	+
	G13A	2	+	-
	G143A	3	+	+
	F21182A	2	+	-

<sup>1</sup>Niveles de severidad; 0 (0%), 1 (≤20%), 2 (21-40%) y 3 (≥41%), de acuerdo al por ciento visual de tejido infectado.

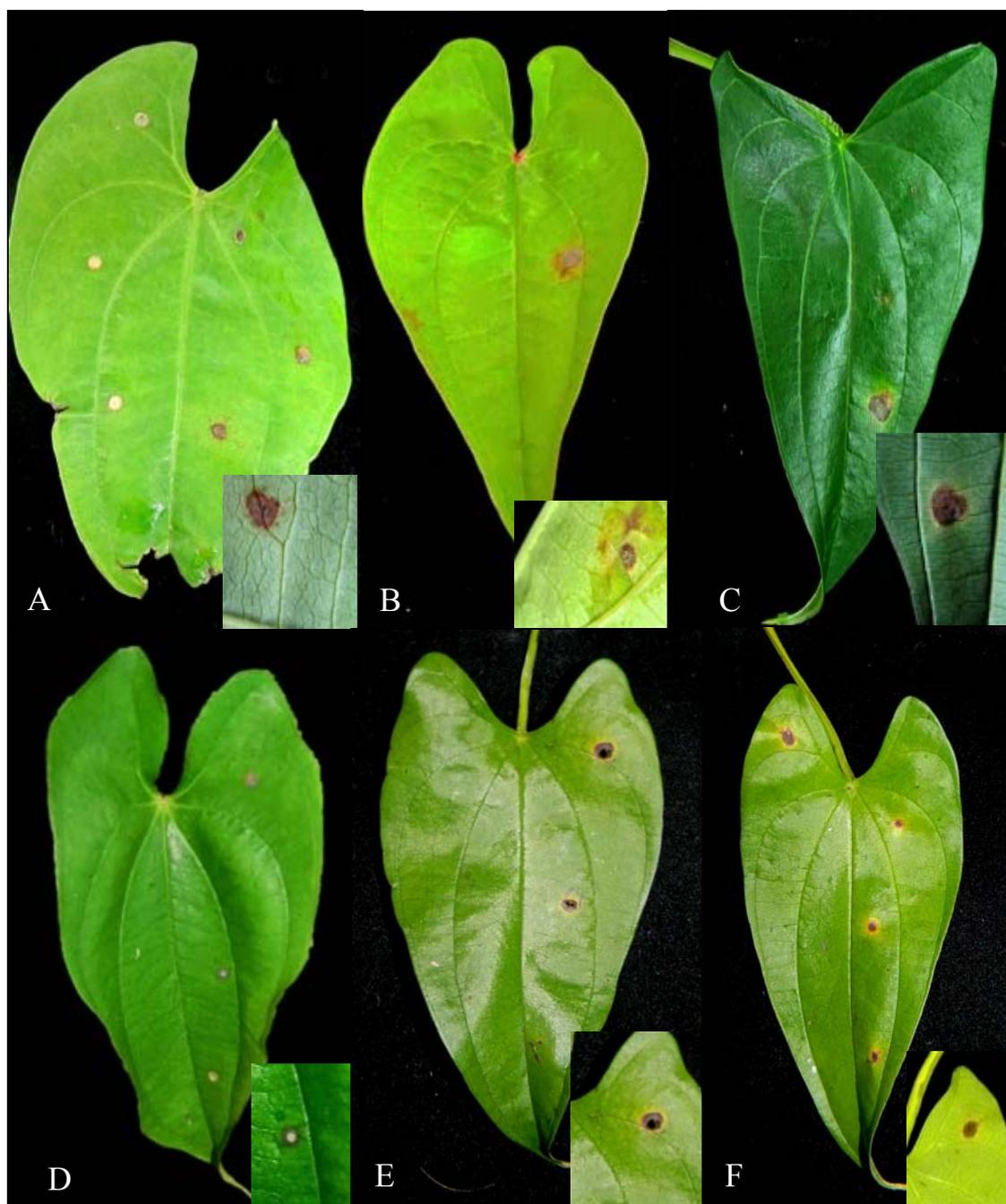
<sup>2</sup>F= se refiere a fincas privadas.

<sup>3</sup>G= se refiere a colección de germoplasma ubicada en predios de UPRM en Corozal, Puerto Rico.

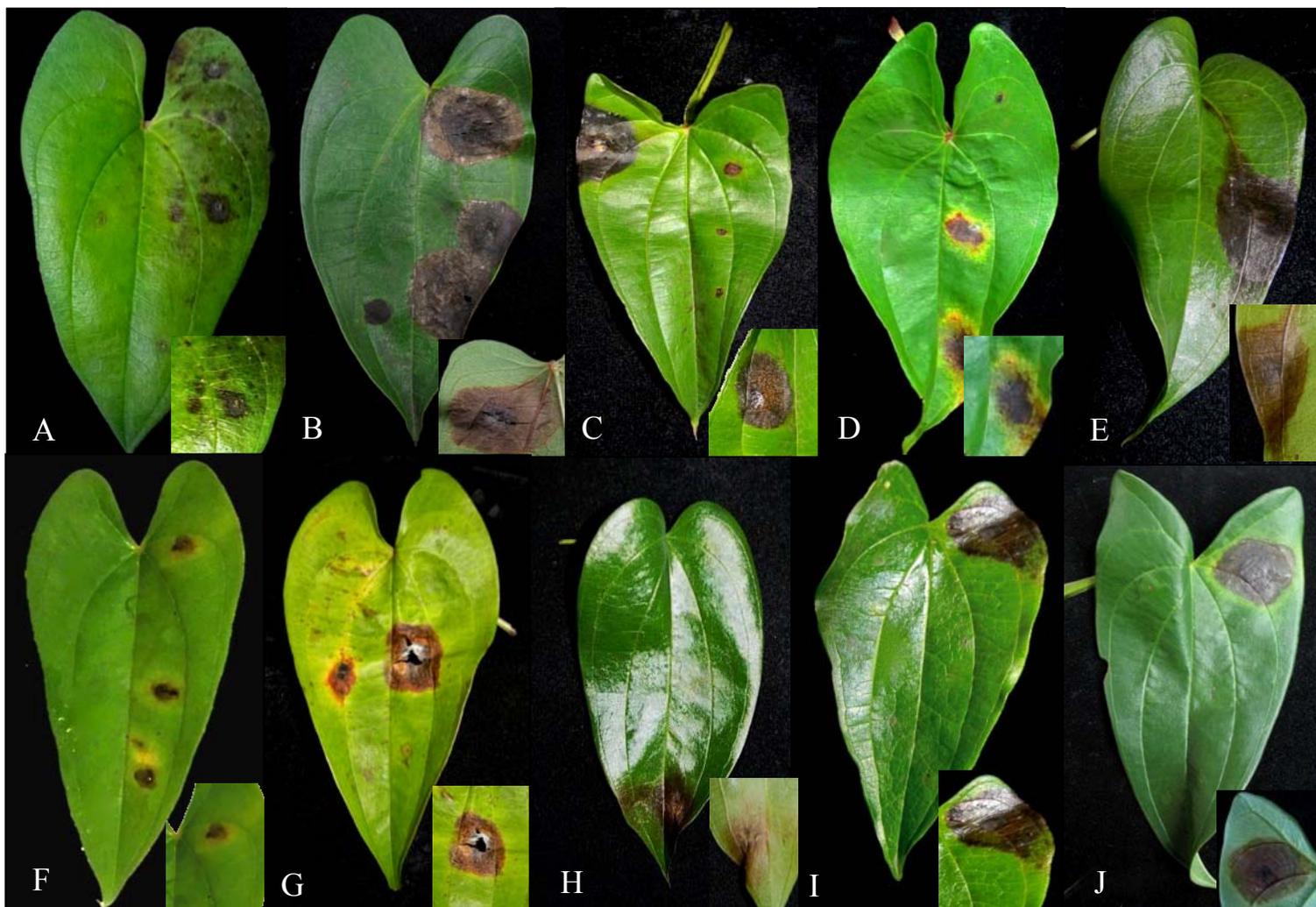
<sup>4</sup>Aislado no patogénico

<sup>5</sup>(+) Patogénico.

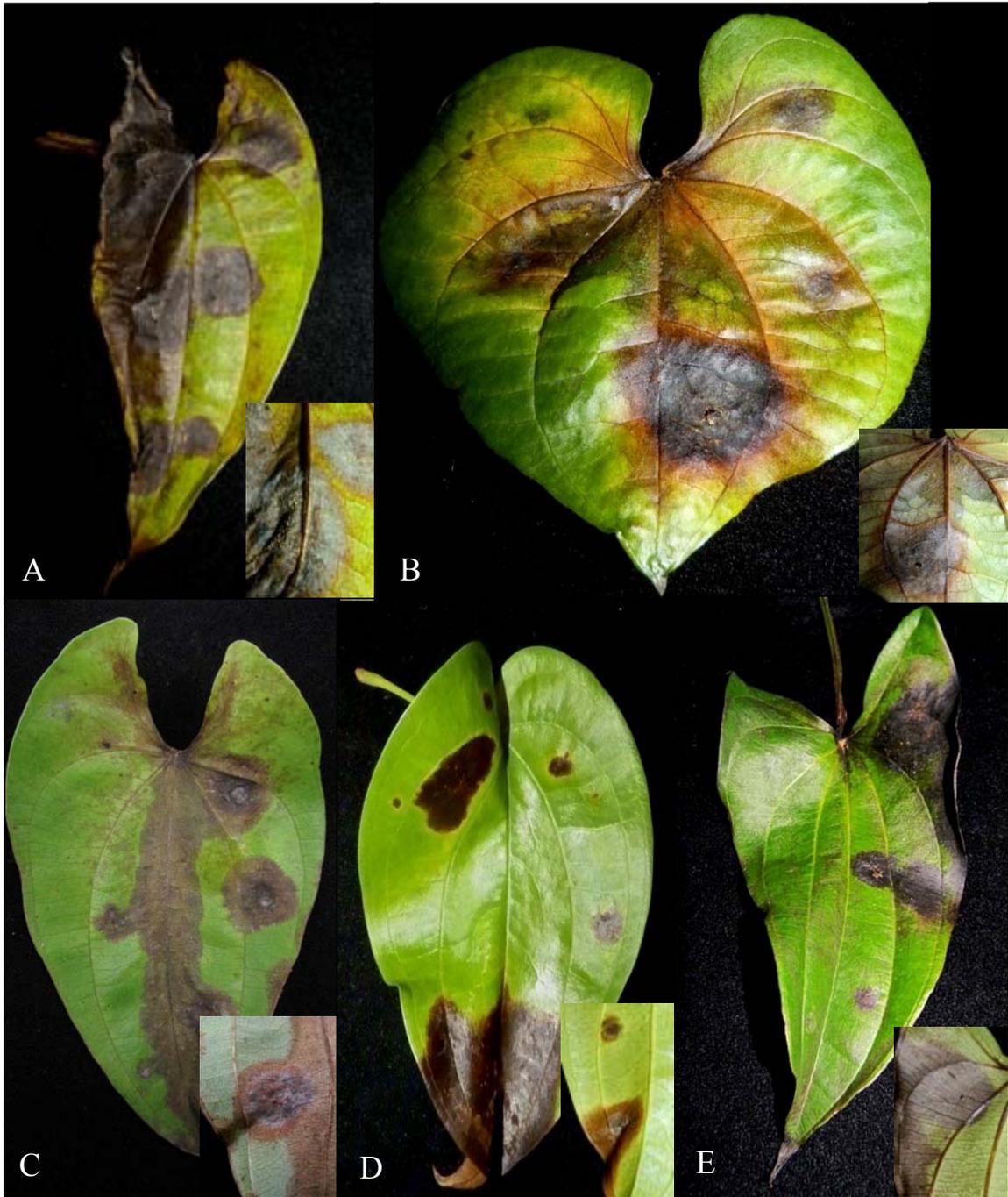
<sup>6</sup>(-) No patogénico.



**Figura 53.** Pruebas de patogenicidad realizadas en tejido foliar de *Dioscorea alata* que mostraron nivel 1 ( $\leq 20\%$ ) de severidad. [A] *Colletotrichum tropicale* G73D; [B] *C. gloeosporioides* G12B; [C] *C. alatae* F133251A; [D] *C. siamense* G12D; [E] *C. aoteora* G81; [F] *C. cliviae* G61B.



**Figura 54.** Pruebas de patogenicidad realizadas en tejido foliar de *Dioscorea alata* y *D. rotundata* que mostraron nivel 2 (21-40%) de severidad. [A-B] *Colletotrichum siamense* G42B y F11244A; [C] *C. alatae* F52251A; [D-E] *C. cliviae* G14B y F85241C; [F-G] *C. tropicale* G13A y G153A; [H] *C. truncatum* F21182A; [I]. *C. ignotum* F11244B; [J] *C. gloeosporioides* F52252D.



**Figura 55.** Pruebas de patogenicidad realizadas en tejido foliar de *Dioscorea alata*, *D. esculenta* y *D. rotundata* que mostraron nivel 3 ( $\geq 41\%$ ) de severidad. [A] *Colletotrichum tropicale* G143A; [B] *C. theobromicola* G121B; [C-D] *C. fructicola* G62A y G23B; [E] *C. alatae* F52253A.



**Figura 56.** Pruebas de patogenicidad realizadas en tejido foliar de *Dioscorea esculenta* que mostró un nivel 0 (0%) de severidad. *Colletotrichum karstii* (G122A).

### **Caracterización molecular de los aislados de *Colletotrichum***

Se obtuvo una secuencia consenso a partir de las secuencias obtenidas en las tres regiones genéticas amplificadas de las diferentes especies de *Colletotrichum*. Aquellas especies de las cuales no se pudo obtener una secuencia consenso, se utilizó la que presentó mejor porcentaje de calidad (Apéndice G). El tamaño de los productos de PCR variaron de acuerdo a la región genética amplificada. Estos fueron 300, 600 y 700 pb para los genes GAPDH, la región ITS de ADNr y  $\beta$ -tubulina, respectivamente.

Utilizando las tres regiones genéticas antes mencionadas, se identificaron once especies de *Colletotrichum* de diferentes especies y cultivares de *Dioscorea* (Tabla 13) (Weir et al., 2012). El porcentaje de homología de las secuencias analizadas y comparadas mediante BLAST con las secuencias del GenBank fue mayor de 97% (Tabla 13). Al construir los árboles filogenéticos con el método de “máximo likelihood” para los genes estudiados (ITS,  $\beta$ -tubulina y GAPDH) se establecieron varios grupos monofiléticos o clados (Figura 57-59). El árbol filogenético construido a partir de las secuencias obtenidas de la región de ITS del ADNr separó las especies *C. truncatum*, *C. alatae*, *C. karstii* y *C. cliviae* en clados o grupos monofiléticos. Sin embargo, esta región genética no permitió separar las especies *C. truncatum* y *C. capsici*. También agrupó las especies *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. fragariae*, *C. fructicola*, *C. aotearoa*, *C. ignotum* y *C. gloeosporioides* en un mismo clado. Dentro de este clado *C. gloeosporioides* y *C. theobromicola* fueron agrupados en pequeños clados dentro de este. El aislado de *C. aotearoa* (G81) obtenido del cultivar Diamantes fue agrupado fuera del clado de este. Por lo cual esta región genética no fue efectiva separando especies evolutivamente cercanas como *C. siamense*, *C. tropicale*, *C. fructicola* y *C. ignotum*, lo que concuerda con estudios previos realizados por Weir et al. (2012) (Figura 57).

El árbol filogenético construido con las secuencias del gen de  $\beta$ -tubulina, agrupó las especies de *Colletotrichum* en tres clados. *C. truncatum* y *C. cliviae* fueron agrupadas fuera de las demás especies. Sin embargo, no separa a *C. cliviae* de *C. orchidearum*. El resto de las especies fueron agrupadas en un mismo clado *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. kahawae*, *C. fructicola*, *C. aotearoa*, *C. gloeosporioides* y *C. alatae*. En este clado las especies *C. kahawae*, *C. aotearoa*, *C. theobromicola*, *C. alatae* y *C. gloeosporioides* fueron separadas en pequeños clados dentro de este. Sin embargo, *C. kahawae* estuvo agrupado en el mismo clado de *C. aoteora* (Figura 58).

En el árbol filogenético construido con las Uno de estos clados incluye cuatro subclados donde las secuencias de *C. alatae*, *C. aotearoa*, *C. gloeosporioides* y *C. theobromicola* fueron separadas de las demás especies. Sin embargo, no separó a *C. theobromicola* de *C. fragariae*. Las secuencias de *C. cliviae*, *C. karstii* y *C. truncatum* fueron separadas aparte en tres clados aparte, manteniéndose *C. cliviae* agrupada en un mismo clado con *C. orchidearum* (Figura 59). Las especies *C. fructicola*, *C. ignotum*, *C. tropicale* y *C. siamense* aparentan tener una alta similaridad evolutiva y poca variabilidad entre estas, ya que las tres regiones genéticas utilizadas no fueron capaces de separarlas en clados o grupos monofiléticos diferentes. El árbol filogenético construido con las secuencias del gen de  $\beta$ -tubulina no incluyó la secuencia de *C. ignotum* ya que no se logró obtener una secuencia de calidad.

**Tabla 13.** Similaridad entre las secuencias de tres regiones genéticas (ITS,  $\beta$ TUB y GAPDH) obtenidas de *Colletotrichum* spp. aislados de *Dioscorea* spp., con secuencias previamente reportadas en el GenBank.

Aislados	Gen	Similaridad con secuencias previamente reportadas en el GenBank					
		Número de accesión	Especie	Query Coverage	E- value <sup>1</sup>	Identidad máxima	
<b>G13A<sup>2</sup></b>	ITS	KC512125.1	<i>C. tropicale</i>	100%	0.0	100%	
	$\beta$ TUB	JX010407.1		95%	0.0	100%	
	GAPDH	JX010007.1		92%	4e-143	100%	
<b>G143A</b>	ITS	JX010275.1		99%	0.0	100%	
	$\beta$ TUB	JX010407.1		91%	0.0	100%	
	GAPDH	JX010007.1		74%	4e-142	99%	
<b>G73D</b>	ITS	KC512125.1		100%	0.0	99%	
	$\beta$ TUB	JX010407.1		97%	0.0	100%	
	GAPDH	KC517181.1		87%	2e-119	99%	
<b>G153A</b>	ITS	KC512125.1	100%	0.0	99%		
	$\beta$ TUB	ND <sup>4</sup>	ND	ND	ND		
	GAPDH	KC517186.1	97%	2e-120	100%		
<b>G12B</b>	ITS	FN566872.1	<i>C. gloeosporioides</i>	99%	0.0	100%	
	$\beta$ TUB	JX827449.1		98%	0.0	99%	
	GAPDH	JX827437.1		99%	3e-142	100%	
<b>F52252D</b>	ITS	JQ580526.1		98%	0.0	99%	
	$\beta$ TUB	JX827449.1		100%	0.0	92%	
	GAPDH	JX827437.1		100%	1e-135	100%	
<b>G12D</b>	ITS	JX010278.1		<i>C. siamense</i>	96%	0.0	99%
	$\beta$ TUB	KF877323.1			99%	0.0	99%
	GAPDH	JX009924.1			99%	6e-129	97%
<b>F11244A</b>	ITS	JX010278.1	100%		0.0	99%	
	$\beta$ TUB	JF811021.1	99%		0.0	98%	
	GAPDH	JX010002.1	99%		1e-131	99%	
<b>G42B</b>	ITS	KJ813613.1	99%		0.0	99%	
	$\beta$ TUB	JF811021.1	99%		0.0	99%	
	GAPDH	JX010002.1	99%		3e-137	99%	
<b>G14B</b>	ITS	KC702980.1	<i>C. cliviae</i>	97%	0.0	100%	
	$\beta$ TUB	HM585423.1		99%	0.0	100%	
	GAPDH	JX546611.1		100%	5e-119	99%	
<b>G61B</b>	ITS	KC702980.1		98%	0.0	99%	
	$\beta$ TUB	HM585423.1		100%	0.0	100%	
	GAPDH	JX546611.1		96%	2e-118	98%	
<b>F85241C</b>	ITS	KC702974.1		99%	0.0	99%	
	$\beta$ TUB	HM585423.1		99%	0.0	99%	
	GAPDH	JX546611.1		96%	1e-120	99%	

<sup>1</sup> Similaridad favorable. Se espera un valor de cero para altos porcentajes de homología entre las secuencias de ADN.

<sup>2</sup> G= se refiere a colección de germoplasma ubicada en predios de UPRM en Corozal, Puerto Rico.

<sup>3</sup> F=se refiere a fincas privadas; <sup>4</sup> No hay datos para esta secuencia. Secuencias con un nivel de calidad muy bajo.

Tabla 13. Continuación

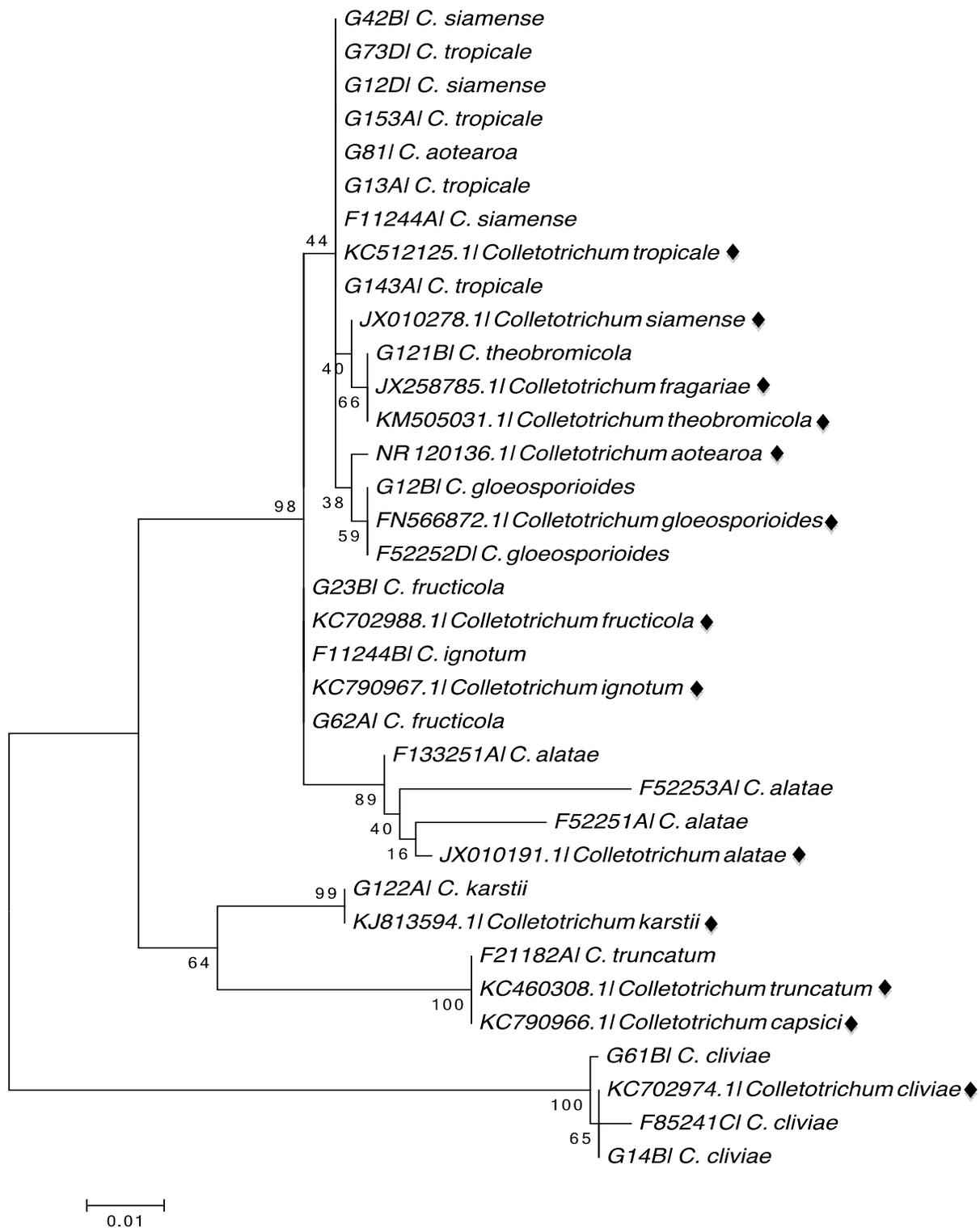
Aislados	Gen	Similaridad con secuencias previamente reportadas en el GenBank				
		Número de Accesión	Especie	Query Coverage	E- value <sup>1</sup>	Identidad máxima
<b>G23B<sup>2</sup></b>	ITS	KC702988.1	<i>C. fructicola</i>	99%	0.0	100%
	βTUB	KJ420049.1		98%	4e-172	96%
	GAPDH	JX009946.1		99%	2e-144	100%
<b>G62A</b>	ITS	KF620965.1	<i>C. fructicola</i>	99%	0.0	100%
	βTUB	ND		ND	ND	ND
	GAPDH	JX009946.1		98%	2e-143	100%
<b>G121B</b>	ITS	KM505031.1	<i>C. theobromicola</i>	99%	0.0	99%
	βTUB	KF768557.1		95%	0.0	99%
	GAPDH	JX009957.1		98%	1e-130	99%
<b>G81</b>	ITS	NR_120136.1	<i>C. aotearoa</i>	100%	0.0	99%
	βTUB	KC297088.1		99%	0.0	98%
	GAPDH	JX009906.1		99%	6e-134	99%
<b>G122A</b>	ITS	KJ813594.1	<i>C. karstii</i>	100%	0.0	100%
	βTUB	ND <sup>4</sup>		ND	ND	ND
	GAPDH	KM055654.1		100%	6e-98	99%
<b>F133251A<sup>3</sup></b>	ITS	NR120135.1	<i>C. alatae</i>	99%	0.0	99%
	βTUB	JX010383.1		93%	0.0	100%
	GAPDH	JX009990.1		98%	5e-150	100%
<b>F52253A</b>	ITS	JX010191.1	<i>C. alatae</i>	100%	0.0	97%
	βTUB	ND		ND	ND	ND
	GAPDH	JX009990.1		98%	2e-148	99%
<b>F52251A</b>	ITS	JX010191.1	<i>C. alatae</i>	94%	0.0	94%
	βTUB	JX010383.1		82%	0.0	97%
	GAPDH	JX009990.1		99%	5e-150	100%
<b>F21182A</b>	ITS	KC460308.1	<i>C. truncatum</i>	100%	0.0	100%
	βTUB	KC109476.1		98%	0.0	99%
	GAPDH	KC109590.1		99%	1e-146	99%
<b>F11244B</b>	ITS	KC790967.1	<i>C. ignotum</i>	100%	0.0	100%
	βTUB	ND		ND	ND	ND
	GAPDH	JN861218.1		99%	5e-140	99%

<sup>1</sup> Similaridad favorable. Se espera un valor de cero para altos porcentajes de homología entre las secuencias de ADN.

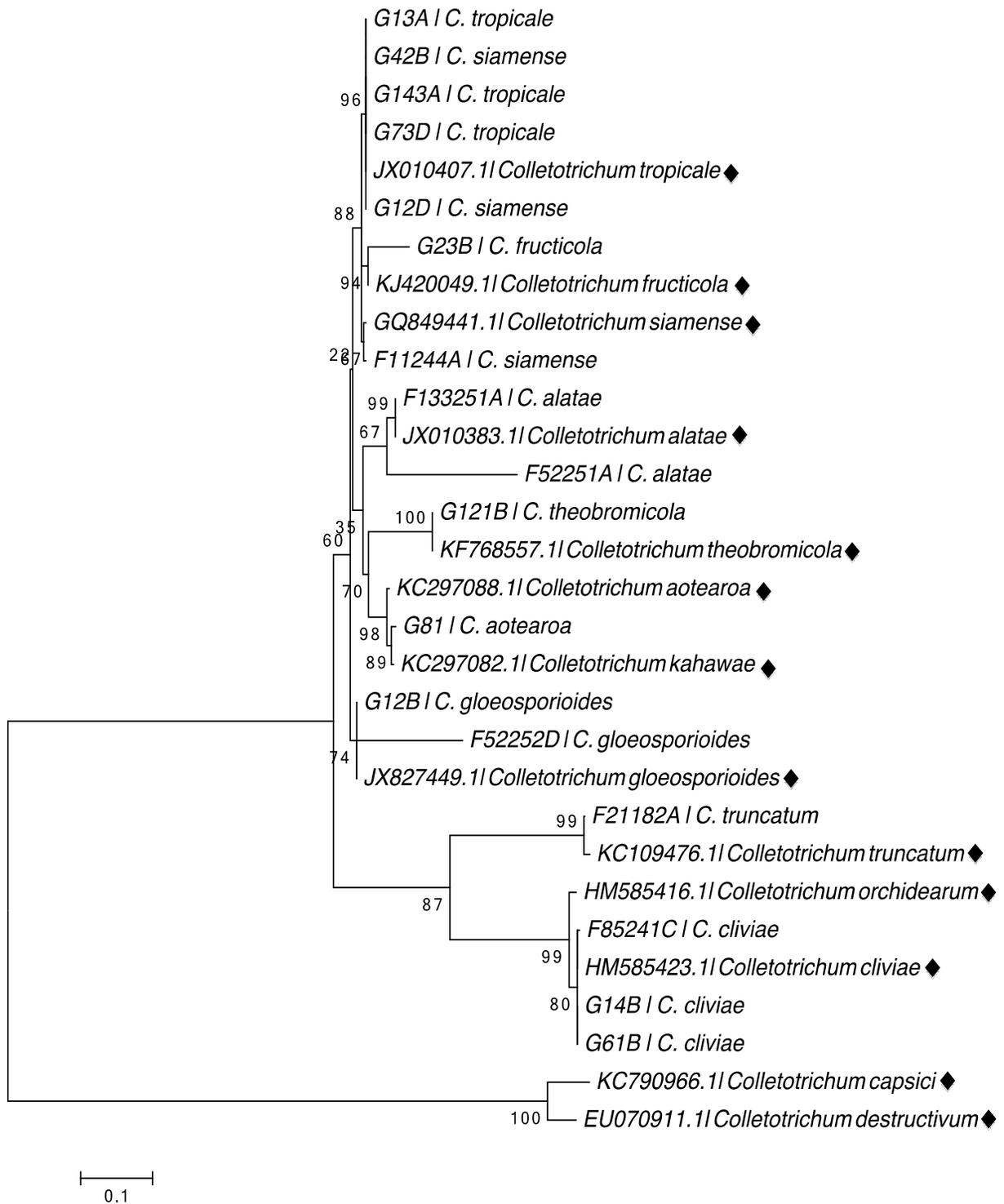
<sup>2</sup> G= se refiere a colección de germoplasma ubicada en predios de UPRM en Corozal, Puerto Rico.

<sup>3</sup> F=se refiere a fincas privadas.

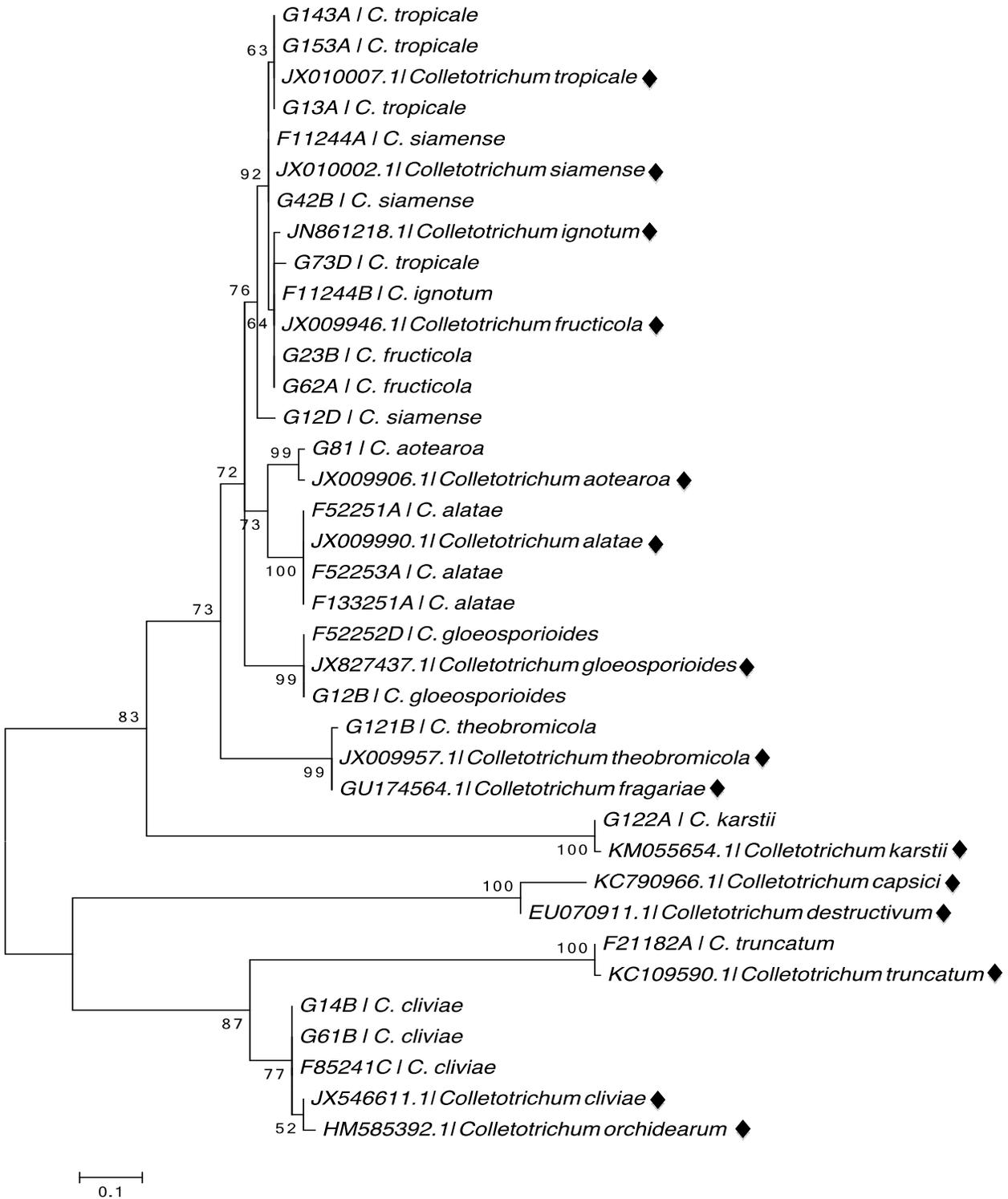
<sup>4</sup> No hay datos para esta secuencia. Secuencias con un nivel de calidad muy bajo.



**Figura 57.** Árbol filogenético construido de las secuencias de la región ITS del ADNr obtenidas de *Colletotrichum* spp. aislados de *Dioscorea* spp. Secuencias obtenidas del GenBank (◆). Outgroup; *C. destructivum*.



**Figura 58.** Árbol filogenético construido de las secuencias del gen de  $\beta$ -tubulina obtenidas de *Colletotrichum* spp. aislados de *Dioscorea* spp. Secuencias obtenidas del GenBank (◆). Outgroup; *C. destructivum*.



**Figura 59.** Árbol filogenético construido de las secuencias del gen de GAPDH obtenidas de *Colletotrichum* spp. aislados de *Dioscorea* spp. Secuencias obtenidas del GenBank (♦). Outgroup; *C. destructivum*.

## DISCUSION

El hongo fitopatógeno más importante del tejido foliar del ñame, es *C. gloeosporioides*, agente causal de la candelilla. Un aspecto crucial para el manejo de esta enfermedad es la correcta identificación de las distintas especies patogénicas. Con la excepción de la comúnmente identificada, *C. gloeosporioides*, en Puerto Rico ha sido muy limitada la investigación dirigida a identificar detalladamente las especies de este hongo que afectan el cultivo (González-Vélez, 2006; Mignucci et al., 1988; González-Vélez, 1989). Esta tendencia también se ve reflejada en África, el principal productor de ñame a nivel mundial, a pesar de ser un centro de investigación en lo que respecta a este cultivo. En África, Amusa (1996) aisló a *C. graminicola*, *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum* a partir de manchas necróticas del tejido de *D. alata* y *D. rotundata*. Sin embargo, sólo *C. graminicola* y *C. gloeosporioides* demostraron ser patogénicas. Ayodele (2003) reportó a *C. truncatum* como responsable de causar la antracnosis en el follaje de *D. rotundata*. Ninguna de estas investigaciones realizó una caracterización más completa del género que incluyera aspectos moleculares que permitieran confirmar la identidad de estas especies. Aquellas investigaciones que han llevado a cabo caracterización molecular de *Colletotrichum* spp. en este cultivo, sólo han reportado a *C. gloeosporioides*, *C. alatae* y *C. fructicola*, en *D. alata* y a *C. siamense* en *D. rotundata* como agentes causales de enfermedades foliares (Abang et al., 2002-2006; Aduramigba et al., 2012; Weir et al., 2012). En Puerto Rico, las investigaciones más recientes han estado dirigidas a evaluar las prácticas para el control de la enfermedad, sin enfatizar la caracterización de especies o la correcta identificación de las mismas con técnicas modernas (González-Vélez, 2006 y 1989; Mignucci et al., 1988). Nuestra investigación contempla poder responder a esta interrogante combinando la caracterización morfológica y patogénica con aspectos moleculares que nos permitan identificar las especies de

*Colletotrichum* spp. que ocurren en las diferentes especies y variedades de ñame.

De los síntomas foliares observados y colectados en el campo, se obtuvieron 259 aislados de hongos y once de bacterias, lo cual demuestra, que la observación de síntomas en el campo no es suficiente criterio para discernir cuál es el agente causal de las lesiones, ya que de una misma lesión se pueden aislar diversas especies de hongos, incluyendo bacterias. Es por esto que es necesario realizar pruebas de patogenicidad que demuestren que el hongo en cuestión es el causante de algún tipo de lesión. Durante el muestreo realizado en la colección de germoplasma se pudo observar que las variedades de *D. alata* mostraron los síntomas más severos. Estos hallazgos eran de esperarse ya que esta especie se reporta como la más susceptible a enfermedades foliares (Egesi et al., 2007; Onyeka et al., 2006; González-Vélez, 2006; Abang et al., 2002). *D. rotundata* a pesar de reportarse como tolerante (González-Vélez, 2006; Mignucci et al., 1988), presentó síntomas similares a los observados en *D. alata*. Una de las especies de ñame que presentó mayor sintomatología (manchas necróticas, daño foliar) en el campo fue *D. esculenta*, comúnmente utilizada para consumo a nivel mundial (Asiedu et al., 2010; Opara, 2003; Rodríguez, 2000). Es importante señalar que la sintomatología observada en la colección de germoplasma también fue observada durante el catastro realizado en fincas privadas con mayor producción de ñame. La severidad de la enfermedad en algunos pueblos se relacionó a las localidades de las fincas, las especies que estos sembraban y prácticas o métodos de siembra que los agricultores utilizaban. Los pueblos con mayor severidad (igual o mayor de 4) en la especie *D. alata* fueron Moca y Barranquitas, y en *D. rotundata*, Barranquitas y Utuado. En general, los predios de *D. alata* presentaron niveles de severidad altos en todos los municipios evaluados. Entre los factores que pueden estar contribuyendo a esta dinámica, está la localización de estos municipios en el centro de la isla, donde las temperaturas predominantes son frescas (80 a 87°C)

y hay mayor humedad relativa (71 a 90%). Otros factores están relacionados a las prácticas de manejo de siembras. Por ejemplo, los agricultores en Barranquitas no realizan control de malezas y no estacan la especie *D. alata*. Estos factores aportan al desarrollo de la enfermedad. La falta de estacado propicia mayor humedad en el follaje de las plantas creando un micro clima favorable para el crecimiento de la mayoría de los hongos, especialmente de *Colletotrichum* spp. (Agrios, 2005). En Moca, a pesar de los agricultores mantienen los predios limpios y estacados, los cultivares de *D. alata* estaban bien deteriorados, con una alta incidencia de la enfermedad. Los pueblos con el menor nivel de severidad (nivel 1) en *D. rotundata* fueron Aguada y Moca. Los agricultores de estos municipios mantienen los predios libres de malezas y estacan u organizan las plantas en cerones. Ambas prácticas ayudan a reducir el desarrollo de la enfermedad.

De la sintomatología evaluada se obtuvieron un total de 66 aislados de *Colletotrichum* spp. asociados a las especies de *Dioscorea* spp. El mayor número de aislados de hongos se obtuvo de *D. alata*. Esto era de esperarse, ya que además de ser la especie de ñame más susceptible a patógenos foliares, y de la cual se evaluaron la mayor cantidad de variedades. La segunda especie de la cual se obtuvo el mayor número de aislados de *Colletotrichum* spp. fue *D. rotundata*. Estos resultados no concuerdan con lo reportado previamente en la isla para esta especie (González-Vélez, 2006). En otras partes del mundo sí se observa una mayor frecuencia de aislados de *Colletotrichum* spp., afectando *D. rotundata* en comparación a *D. alata* (Amusa et al., 2003). De los aislados caracterizados, *C. cliviae*, *C. siamense*, y *C. gloeosporioides*, están presentes en diferentes regiones de la isla. Estos se identificaron tanto en el catastro realizado en la colección de germoplasma localizada en Corozal, así como en fincas privadas alrededor de la isla.

Algunos de los aislados de *Colletotrichum* spp. caracterizados mostraron diferentes patrones de crecimiento, tanto en las curvas como en las colonias, aún siendo de la misma especie. Esto se observó en los aislados de *C. tropicale* (4), *C. siamense* (3), *C. alatae* (3) *C. cliviae* (3), *C. fructicola* (2) y *C. gloeosporioides* (2), los cuales mostraron características fenotípicas diferentes en medios de cultivo. Los aislados de *C. tropicale*, *C. alatae* y *C. gloeosporioides*, obtenidos de *D. alata* presentaron colonias con apariencia diferentes. Esto sugiere que la morfología de estos hongos varía de acuerdo a la variedad de ñame que están afectando y no a la especie. En el caso de *C. cliviae*, dos (G61B y F85241C) de los tres aislados obtenidos de especies de ñame diferentes, mostraron tener las mismas características fenotípicas. El único que pudo diferenciarse de los demás aislados, fue el aislado F21182A (*C. truncatum*) por la particularidad de sus conidias largas y con los ápices fusiformes. Abang (2009) menciona que *C. gloeosporioides*, a pesar de ser una misma especie este puede tener diferentes formas de crecimiento y de patogenicidad, lo que podría ocurrir con las demás especies de este hongo. La identificación morfológica de especies dentro del género *Colletotrichum* resulta ser complicada por la similitud en tamaño y forma de conidios y apresorios, características de la colonia, tasas de crecimiento y la ausencia de estados teleomórficos (Hyde et al., 2009a; Photita et al., 2005; Hyde et al., 2009b). Dos factores que podrían afectar la caracterización morfológica confiable de este hongo son la variabilidad de las colonias de acuerdo a las condiciones ambientales, y la transferencia continua del mismo en medio de cultivo (Weir et al., 2012). Con algunos aislados de *C. fructicola* y *C. siamense* no se observó gran producción de apresorios. Esto no significa que estos aislados no puedan penetrar o ser patogénicos, ya que como menciona O'Connell (2000) este hongo no siempre necesita del apresorio para penetrar el tejido, este lo puede hacer indirectamente por medio de estomas o aperturas en el tejido. Esto se pudo demostrar en esta

investigación, ya que de los aislados evaluados, algunos mostraron ser patogénicos con y sin herida en el tejido.

En términos patogénicos, el único aislado de *C. karstii* obtenido de *D. esculenta* cv. Muni no causó patogenicidad. Es posible que esta especie de *Colletotrichum* no afecte el ñame, ya que no ha sido reportada en este cultivo. □ Para poder confirmar este dato, habría que realizar varias pruebas de patogenicidad en las demás especies de ñame. *C. tropicale* es capaz de infectar con o sin herida el tejido foliar de *D. alata*. observándose diferentes grados de virulencia en los diferentes aislados evaluados. Los diferentes niveles de severidad de *C. tropicale* podría estar relacionados con la variabilidad genética de *D. alata*, o sea, a los diferentes niveles de resistencia que ocurren en las cuatro variedades evaluadas. Mignouna (2001) reportó que en algunas variedades de *D. alata* existe resistencia natural a la antracnosis. Sin embargo, se desconoce sobre los niveles de resistencia a nivel mundial debido a la falta de segregación en las poblaciones de ñame. Este hongo es capaz de infectar algunas variedades de ñame sin herida en el tejido, lo cual se puede relacionar con la abundante producción de apresorios y al grosor de la cutícula de estas plantas. Mientras menos gruesa la cutícula, mayor es la posibilidad de penetrar efectivamente (Egesi et al., 2007). *Colletotrichum* spp. puede producir fitotoxinas responsables de su patogenicidad y que pueden ser selectivas al hospedero (Alleyne et al., 2008). *C. siamense* fue encontrado en la colección de germoplasma y en fincas privadas afectando mayormente las especies más importantes de ñame a nivel mundial (*D. alata* y *D. rotundata*). Este fue patogénico al tejido foliar de *D. alata* sólo en pruebas con herida, mientras que en *D. rotundata* fue patogénico al tejido foliar tanto en pruebas con como sin herida. Aunque se observaron diferentes niveles de severidad con esta especie de *Colletotrichum*, esta no fue mayor de un 40%. Aún así este porcentaje es suficiente como para causar un daño considerable al cultivo del ñame.

Los aislados de *C. cliviae*, *C. siamense*, y *C. gloeosporioides* mostraron ser patogénicos con y sin herida en el tejido foliar del ñame, y su severidad puede alcanzar un 40%. *C. cliviae* y *C. siamense* mostraron ser patogénicos en *D. alata* y *D. rotundata*. *C. gloeosporioides* solo fue identificado en *D. alata*, lo que era de esperarse ya que este sólo se ha reportado patogénico a esta especie (Abang et al., 2002-2006; Baquero, 2002; Egesi et al., 2009).

Los aislados de *Colletotrichum* que presentaron una tasa de crecimiento lenta, no necesariamente causaron un nivel de severidad bajo o viceversa. Por ejemplo, el aislado F52253A de *C. alatae* a pesar de su tasa de crecimiento lenta, causó una severidad mayor de un 40%. Esto podría ser indicativo de que posiblemente este aislado produce un alto nivel de fitotoxinas y enzimas que pueden degradar el tejido más rápidamente, y que también podría utilizar algunos metabolitos para desactivar las defensas de la planta (Alleyne et al., 2008). El cultivar Forastero de *D. alata* ha sido reportado y utilizado anteriormente en África como una variedad resistente (Egesi et al., 2007). Esto difiere de nuestra investigación, ya que fue susceptible a *C. cliviae* y a *C. fructicola*, observándose un nivel de severidad de 20 a 40%, y más de un 40%, respectivamente. Del tejido foliar de *D. rotundata* identificamos las siguientes especies patogénicas *C. cliviae*, *C. fructicola*, *C. ignotum*, *C. siamense* y *C. truncatum*. *C. truncatum* fue la única especie reportada anteriormente como causante de manchas foliares en ñame (Ayodele et al., 2003), aunque este estudio no evaluó su patogenicidad. Nuestros datos demuestran que a pesar de la tolerancia de *D. rotundata* a *C. gloeosporioides*, esta es afectada por otras especies de *Colletotrichum*.

Es muy limitada la información existente sobre otras especies de *Colletotrichum* que afectan el cultivo del ñame, con excepción de *C. gloeosporioides*. Esto se debe principalmente a la falta de aplicación de varias técnicas efectivas para la identificación de especies, incluyendo

las moleculares. Esta investigación demostró que la región ITS del ADNr no fue muy efectiva en separar algunas de las especies, con excepción de *C. alatae*, *C. cliviae*, *C. karstii* y *C. truncatum*. Tampoco fue eficiente en separar esta última de *C. capcisi*. Los genes de  $\beta$  tubulina y GAPDH fueron más efectivos separando las especies de *C. alatae*, *C. aotearoa*, *C. cliviae*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. theobromicola* y *C. truncatum*. La región ITS de ADNr y el gen de GAPDH no fueron eficientes separando a *C. theobromicola* de *C. fragariae*. Esto concuerda con lo reportado previamente donde se colocan ambas especies en un mismo clado como sinónimos (Weir et al., 2012; Rojas et al., 2010). Encontramos que estas tres regiones genéticas no son tan efectivas separando a *C. fruticola*, *C. ignotum*, *C. siamense* y *C. tropicale*, fuera de un mismo clado, lo cual sugiere que estas especies podrían ser altamente similares y estar relacionadas evolutivamente. Con excepción de *C. gloeosporioides*, todas las especies encontradas en esta investigación son nuevos reportes para el cultivo del ñame en la isla. Estos resultados son de gran relevancia para los esfuerzos que se están realizando en incrementar la producción local del cultivo y en la implementación de prácticas efectivas de control.

## CONCLUSIONES

*D. alata* y *D. rotundata* fueron las especies de ñame más susceptibles a la antracnosis. Los cultivares Florido y PI 15587 de *D. alata*, y Guinea de *D. rotundata*, fueron los cultivares que mostraron los mayores niveles de severidad. El pueblo de Barranquitas fue el de mayor incidencia de antracnosis en la isla. Las especies de *Colletotrichum* asociadas al follaje del ñame alrededor de la isla son *C. alatae*, *C. aotearoa*, *C. cliviae*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. ignotum*, *C. siamense*, *C. tropicale*, *C. theobromicola*, y *C. truncatum*. Nueve de estas especies son nuevos reportes para este cultivo en la isla. *C. alatae*, *C. cliviae*, *C. fructicola*, *C. siamense*, y *C. tropicale* fueron las especies más frecuentemente encontradas alrededor de la isla.

*D. rotundata*, reportada previamente como tolerante a esta enfermedad, mostró ser susceptible a *C. aotearoa*, *C. cliviae*, *C. fructicola*, *C. ignotum*, *C. siamense* y *C. truncatum*. Basado en nuestro conocimiento y en la revisión de literatura realizada, este es el primer reporte de *C. aotearoa*, *C. cliviae*, *C. ignotum*, *C. theobromicola*, *C. truncatum* y *C. tropicale*, siendo patógenas a *Dioscorea* spp. a nivel mundial. *C. karstii* aislada de *D. esculenta* cv. Muni, fue la única especie de *Colletotrichum* identificada que no fue patógena. *C. truncatum* aislada de *D. rotundata* cv. Guinea Negro, fue la única especie incapaz de infectar el tejido de la planta sin herida. Las curvas de crecimiento realizadas mostraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de algunas especies. Las especies que mostraron tasas de crecimiento más lentos fueron *C. alatae* y *C. cliviae*.

Los análisis filogenéticos demostraron que las regiones genéticas utilizadas (ITS de ADNr,  $\beta$ TUB y GAPDH) no separan las especies *C. cliviae* de *C. orchidorum*. Las regiones genéticas de GAPDH y  $\beta$ TUB resultaron más efectivas separando la mayoría de las especies.

Aun así, estas no lograron separar las especies de *C. fructicola*, *C. ignotum*, *C. siamense* y *C. tropicale* entre ellas.

## LITERATURA CITADA

- Abang, M. M., Winter, S., Green, K. R., Hoffman, P., Mignouna, H. D. y Wolf, G. A. 2002. Molecular Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology*. Vol. 51: 63-71.
- Abang, M. M., Winter, S., Mignouna, H. D., Green, K. R. y Asiedu, R. 2003. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic to understand yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 2(12): 486-496.
- Abang, M. M., Fagbola, O., Smalla, K. y Winter, S. 2005. Two Genetically Distinct Populations of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Causing Anthracnose Disease of Yam (*Dioscorea* spp.). *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Germany*. 137-142.
- Abang, M.M., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G. A., Mignouna, H. D. y Winter, S. 2006. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany*. 51-61.
- Abang, M. M., Abraham, W. R., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G. y Winter, S. 2009. Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycological Research*. Vol. 113(1): 130–140. doi:10.1016/j.mycres.2008.09.004
- Aduramigba-Modupe A. O. 2012. Genetic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* in Nigeria using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11(33): 8189–8195. doi:10.5897/AJB11.230
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Department of Plant Pathology, University of Florida. Fifth Edition. 439-500. Elsevier Academic Press.
- Akem, C. N. 1999. Yam Die-Back and its Principal Cause in the Yam Belt of Nigeria. *Plant Health Management Division. International Institute of Tropical Agriculture, PMB 5320, Ibadan, Nigeria*. <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/1999/1106-1109.pdf>
- Amusa, A.N., Ikotun, T. y Bankole, J.O. 1996. Short communication: Survey of leaf spot-causing microorganisms on yams. *Phytopathology Laboratory, Department of Agricultural Biology, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria*. *African Crop Science Journal*. Vol. 4(1): 111-113.
- 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*. Vol. 2 (12): 497-505.

Alleyne, A. T. y O'Garro, L. W. 2008. Host selectivity of a 40kDa phytotoxic extract from *Colletotrichum gloeosporioides* (*Phyllachoraceae*) on yam *Dioscorea alata* (*Dioscoreaceae*). Caribbean Journal of Science. Vol. 44(1): 1–12.

Asiedu, R., Mignouna, H., Odu, B. y Hughes, J. A. 2010. Yam breeding, International Institute of Tropical Agriculture PMB 5320, Oyo Road. Ibadan, Nigeria. (A): 466–475.

Asiedu, R., y Sartie, A. 2010. Crops that feed the World 1. Yams. Food Security. Vol. 2(A): 305–315. doi:10.1007/s12571-010-0085-0

Asiedu, R., Mignouna, H., Odu, B. y Hughes, J.d'A. 2003. Yam breeding. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan. Nigeria. 466-469.

Ayodele, M.A., Hughes, J. d'A. y Asiedu, R. 2003. Yam Anthracnose Disease: Field symptoms and laboratory diagnostics. International Institute of Tropical Agriculture. África. 1-16.

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.

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.

Barnett, H. L. y Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. Cornell University Press.

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.

Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P., Weir, B., Waller, J., Abang, M. M. y Yang, Y. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* (39): 183–204.

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

Cannon P. F., Damm U., Johnston P. R. y Weir B. S. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*. Vol. 73: 181–213.

Cardona J. 2007. Distancia de siembra en la producción y calidad de ñame Guinea Negro (*D. rotundata*). *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. Vol. 91(1-2): 61-65.

Chaky, J., Anderson, K., Moss, M. y Vaillancourt, L. 2001. Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination in *Colletotrichum graminicola*. Department of Plant Pathology, Agricultural Science Center - North, University of Kentucky, Lexington 40546.

Biochemistry and cell biology. 558-564.

Chowdappa, P., Chethana, C. S., Bharghavi, R., Sandhya, H. y Pant, R. P. 2012. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. isolates causing anthracnose of orchids in India. *Biotechnol.Bioinf.Bioeng.* Vol. 2(1): 567–572.

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.

Crouch, J. A., Clarke, B. B., Jr, J. F. W. y Hillman, B. I. 2009. Systematic analysis of the falcate-spored gramicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. Vol. 101(5), 717–732. doi:10.3852/08-230

Daigle, D. J. y Cotty, P. J. 1994. Stability of *Colletotrichum truncatum* in culture influences mycoherbicide efficacy. USDA, ARS, Southern Regional Research Center, New Orleans, Louisiana. 397-400.

De Paula, H. 2000. Variabilidade de isolados de *Curvularia eragrostidis* (henn.) meyer causando queima das folhas do inhame (*Dioscorea cayennensis* lam.) no estado de pernambuco. Disertación presentada para el Programa de Postgrado en Protección Vegetal de la Universidad Federal Rural de Pernambuco. 1-32.

Delebo Osunde, Z. 2008. Minimizing Postharvest Losses in Yam (*Dioscorea* spp.): Treatments and Techniques. Department of Agricultural Bioresources Engineering, Federal University of Technology, Minna, Nigeria. 1-10.

Deising, H. B., Werner, S. y Wernitz, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection.* Vol. 2: 1631–1641. doi:10.1016/S1286-4579(00)01319-8

Departamento de Agricultura. 2011. Compendio Estadístico. Oficina de Estadísticas Agrícolas. San Juan, P.R.

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): 536–543. doi:10.1111/j.1439-0434.2007.01273.x

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(February). 113–118. Retrieved from [http://www.academicjournals.org/aJaR/PDF/pdf/2009/Feb/Egesi et al.pdf](http://www.academicjournals.org/aJaR/PDF/pdf/2009/Feb/Egesi%20et%20al.pdf)

Einax, E. y Voight, K. 2003. Oligonucleotide primers for the universal amplification of B-tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Org. Divers. Evol.* (3): 185–194. doi:10.1078/1439-6092-00069

Emua, S. A. y Fajola, A. O. 1983. Quematical Control of Two Leaf Spot Diseases of Cluster Yam (*Dioscorea dumetorum*) caused by *Cercospora contraria* and *Didymosphaeria donacina*. Department of Botany, University of Ibadan, Nigeria. Plant Disease. (67): 389-391.

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

Fernandez, J. 2005. Incidencia Y Caracterización: Morfológica, patogénica y genética de *Alternaria* spp. en cultivos de cebolla del sur de Puerto Rico. Tesis, M.S. Universidad de Puerto Rico. Colegio de Ciencias Agrícolas, Mayaguez Campus. p. 42

FRAC Code, 2013. Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Fungicide Resistance Action Committee. <http://www.frac.info/publication/anhang/FRAC%20Code%20List%202013-final.pdf>

Girardin O., Nindjin C., Farah Z., Escher F., Stamp P. y Otokore D. 1997. Use of Gibberellic Acid to Prolong Dormancy and Reduce Losses during Traditional Storage of Yams. J Sci Food Agric. (77): 172-178.

González Vélez, A., Santiago M. A., y Caloni I. B. 1989. Rendimiento y evaluación sensorial de cultivares de los ñames *D. rotundata* y *D. cayenensis*. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. Vol. 73(4): 381-382.

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. Vol. 73(3): 203-208.

González Vélez, A. 1997. Conjunto Tecnológico para la producción de Raíces y Tubérculos. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Colegio de Ciencias Agrícolas. Estación Experimental Agrícola, Río Piedras, Puerto Rico. Publicación 101. 7-12.

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. Vol. 90(1-2): 75-81.

González Vélez, A. 2011. Rendimiento del ñame Mapuey (*Dioscorea tifida* L.) variando el uso de riego y peso del material de propagación. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. Vol. 95(1-2): 89-92.

González Vega, M. E. 2012. El Ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Mayabeque, Cuba.

Hepperly P. R. y Vazquez F. 1989. Tropical yam (*Dioscorea* spp.) performance in western Puerto Rico. Vol. 73(2): 133-139.

Hyde, K. D. 2009a. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. Fungal Diversity. (39):1-17. Retrieved from <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-1-E.pdf>

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. 2009b. *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity* (39): 147-183.

International Institute of Tropical Agriculture. 2009. Yam. Ibadan, Nigeria. <http://www.iita.org/yam>

Irizarry, H. y Rivera, E. 1993. Yield of two yam (*Dioscorea alata*) cultivars with three planting dates and two planting systems. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. Vol. 77(3-4): 161-166.

Jeeva, M. L., Hedge, V., Makesh Kumar, T., Nair, R.R. y Edison, S. 2005. *Dioscorea alata*, a new host of *Sclerotium rolfsii* in India. Central Tuber Crops Research Institute, Thiruvananthapuram, Kerala. <http://www.ndrs.org.uk/article.php?id=010049>

Kenyon, L., Lebas, B. S. M., y Seal, S. E. 2008. Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific Islands contain many novel badnaviruses: Implications for international movement of yam germplasm. *Archives of Virology*. (153): 877–889. doi:10.1007/s00705-008-0062-5

Levot, V. 2008. Section III. Yams: taxonomy and botany. *Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids*. Crop Production Science in Horticulture Series. (17): 191-210.

Liu, L. C., Santiago Cordova, M. y González A. 1990. Further Evaluation of Herbicides in yam *Dioscorea* sp. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. Vol. 74(3): 221-228.

Lima, J. O., Pereira, J. F., Rincones, J., Barau, J. G., Araújo, E. F., Pereira, G. a G. y Queiroz, M. V. 2009. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Moniliophthoraperniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Genetics and Molecular Biology*, (32): 362–366. doi:10.1590/S1415-47572009000200024

Lubin, D. 1990. Roots, tubers, plantains and bananas in human nutrition. *FAO Food and Nutrition Papers*. 198 <http://www.fao.org/docrep/t0207e/t0207e01.htm>

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 Rico*. Vol. L18(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 Rico*. Vol. 72(2): 179-189.

Mignouna, H. D., Abang, M. M., Green, K. R. y Asiedu, R. 2001. Inheritance of resistance in water yam (*Dioscorea alata*) to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Theoretical and Applied Genetics*. (103): 52–55. doi:10.1007/s001220000531

Mignouna, H. D., Abang, M. M. y Asiedu, R. 2003. Harnessing modern biotechnology for tropical tuber crop improvement: Yam (*Dioscorea* spp.) molecular breeding. African Journal of Biotechnology. Vol. 2 (12): 478-485.

Moize O. 1984. The Nature of Shoot Dominance in White Yam Tubers (*Dioscorea rotundata* Poir.). The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. Vol. L18(4): 335-340.

Montalvo A. E. y Meléndez P. L. 1986. Histopathology of Interrelations between *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dioscoreae* and two nematode species on yam. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. Vol. 70(4): 245-254.

O'Connell, R., Perfect, S., Hughes, B., Carzaniga, R., Bailey, J., y Green, J. 2000. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. *Colletotrichum*; Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. Chapter 5. 57-77.

Okigbo R. N. 2003. A Review of Biological Control Methods for Post Harvest Yams (*Dioscorea* spp.) in Storage in South Eastern, Nigeria. Department of Biological Sciences, Michael Okpara University of Agriculture, Abia, Nigeria.

Onyeka T. J., Petro D., Ano G., Etienne S. y Rubens S. 2006. Resistance in water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in the French West Indies to anthracnose disease based on tissue culture-derived whole-plant assay. Plant Pathology. (55): 671-678

Opara, L. U. 2003. Yams: Post-Harvest Operation. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Palmerston North, New Zealand. [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/inpho/docs/Post\\_Harvest\\_Compndium\\_-\\_Yams.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compndium_-_Yams.pdf)

Oramas, D., Rodríguez, J., González, A. 1990. Effect on yam (*Dioscorea rotundata* Poir) of soil spray and seed treatment with the nematicide-insecticide Oxamyl L, and soil treatments with Phenamiphos 15G. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. (74): No. 2. 103-110.

Osunde, Z. D. 2008. Minimizing Postharvest Losses in Yam (*Dioscorea* spp.): Treatments and Techniques. Using Food Science and Technology to Improve Nutrition and Promote National Development. Department of Agricultural and Bioresources Engineering, Federal University of Technology, Minna, Nigeria. 1-12.

Ovono O. P., Kevers C. y Dommes J. 2010. Effects of storage conditions on sprouting of microtubers of yam (*Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex). Comptes Rendus Biologies. 333, 28-34.

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): 443-455. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05048.x

Photita, W., Taylor, P. W. J., Ford, R., Hyde, K. D. y Lumyong, S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*, (18): 117–133. doi:10.3852/09-157

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

Pinzón Gutiérrez, Y. A., Bustamante, S. L. y Buitrago Hurtado, G. 2013. Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). Grupo de investigación en ñame, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede.

Preston, R. 2008. Measuring Plant Diseases. The study of plant disease epidemics. Chapter 2. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota 55121, U.S.A. 11-31.

Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C. y Hyde, K. D. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity*, (39): 89–109.

Raj, M., Jeeva, M. L., Hegde, V., Vidyadharan, P., Archana, P. V., Senthil Alias Sankar, M. Y Vishnu Nath, S. 2012. Polymerase chain reaction assay for rapid, sensitive detection, and identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing greater yam anthracnose. *Molecular Biotechnology*, (52): 277–284. doi:10.1007/s12033-012-9496-9

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 Vol. 82(4): 619-623.

Ramírez O. D., Green J. J. y Caloni I. B. 1984. Guinea Negro: A High-Yielding Out-of-Season Yam Cultivar. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. Vol. L18(2): 193-198.

Rao, M. M. y George, C. 1990. Studies to extend the dormancy of White yam (*Dioscorea alata* L.). *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. Vol. 74(3): 213-219.

Rebbeck T.R., Troxel A.B. y Norman S. 2007 A retrospective case-control study of the use of hormone-related supplements and association with breast cancer. *Int. J Cancer*, (120):1523–1528

Riley, M. B., Williamson, M. R. y Maloy, O. 2002. Plant disease diagnosis. *The Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-I-2002-1021-01

Ripoche, A., Jacqua, G., Bussière, F., Guyader, S. y Sierra, J. 2008. Survival of *Colletotrichum gloeosporioides* (causal agent of yam anthracnose) on yam residues decomposing in soil. *Applied Soil Ecology*, (38): 270–278. doi:10.1016/j.apsoil.2007.10.015

Rodríguez, W. 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*).

Agronomía Mesoamericana, Vol. 11(2): 133-152.

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

Román, J., Oramas, D. y Green, J. 1984. Nematicide evaluation for the control of the Nematodes of Yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. Vol. L18(2): 157-162.

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*. Vol. L18(4): 383-386.

Román, F. M., Beale A., y Irizarry H. 1991. Efecto de cultivos intercalados en el control de malezas y la producción de ñame y batata. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. Vol. 75(1): 11-18.

Ruiz Pérez, E. E. 2003. Severidad del complejo de Enfermedades foliares en el cultivo de ñame (*Dioscorea alata* L.) en diferentes densidades de siembra y soportes vivos de madera negra *Gliricidia Sepium* (Jacq.) Walp y su rentabilidad en Azuero, Panamá. Tesis M.S. Centro Agronómico Tropical De Investigación y Enseñanza. 1-57.

Siqueira, M. VBM. 2011. Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. *Laboratorio de Ecología Evolutiva e Genética Aplicada, Horticultura Brasileira*. (29): 16-20.

Sosthène Kouassi, H., Bajji, M., Brostaux, Y., Zhiri, A., Samb, A., Lepoivre, P. y Haïssam Jijakli, M. 2012. Development and application of a microplate method to evaluate the efficacy of essential oils against *Penicillium italicum* Wehmer, *Penicillium digitatum* Sacc. and *Colletotrichum musea* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, three postharvest fungal pathogens of fruits. *Univ. Liege - Gembloux Agro-Bio Tech. Plant Pathology Unit. Passage des Déportés, Gembloux, Belgium*. 325-336.

Stevens, R.B. (ed.). 1974. *Mycology Guidebook*. Univ. Wash. Press, Seattle. 736 pp.

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*. Vol. 70(4): 277-286.

Tous Villareal, J. D. 2008. Caracterización morfológica y molecular del hongo *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en ñame (*Dioscorea* spp.) en los departamentos de Bolívar, Córdoba y Sucre. Tesis de grado. Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias. Programa de Biología, 1–94.

Twumasi, J. K. 1986. Fungi Associated with the tar spot disease of water yam (*Dioscorea alata* L.) in Ghana. *Crops Research Institute, P.O. Box 3785, Kumasi, Ghana*. 1-4.

Wanasundera J.P.D., y Ravindran G. 1994. Nutritional assesment of yam (*Dioscorea alata*) tubers. Plant Foods for Human Nutrition, Vol. 46 (1): 33-39.

Weir, B. S., Johnston, P. R., y Dam, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Landcare Research, Private Bag 92170 Auckland, New Zealand. 115-176.

Wu W-H, Liu L-Y, Chung C-J, Jou H-J. y Wang T-A. 2005. Estrogenic effect of yam ingestion in healthy postmenopausal women. Journal of the American College of Nutrition, Vol. 24(4): 235–243.

## **Apéndice A**

Formularios del catastro realizado en las diferentes fincas alrededor de la isla.

A-1. Fincas de San Lorenzo.

<b>UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO</b> <b>RECINTO UNIVERSITARIO DE</b> <b>MAYAGUEZ</b> 65 P.O. BOX 9000 Mayaguez, PR 00681-9000 Colegio de Ciencias Agrícolas Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales		Fecha: <u>12-Oct-2013</u> ID Proyecto: <u>Z-FIDA 22</u> Investigador: <u>Stephane Fuentes</u> Localización: <u>Bo. Quebrada Are</u> <u>S.L.</u> Agricultor: <u>Gilcar Carrillo</u>
<b>INFORMACION DE LA ESPECIE</b>		
Nombre común: <u>Adombrado</u>	Nombre científico: <u>D. rotundata</u>	
Nombre común: <u>Guinea</u>	Nombre científico: <u>D. rotundata</u>	
Nombre común: _____	Nombre científico: _____	
<b>DATOS DE LOCALIZACION</b>		
Fotos: Desde: _____ Hasta: _____		
Distancia: _____		
Latitud: <u>29.6m</u>	Longitud: _____	Elevación: <u>850 ft</u>
Temperatura: <u>89° F</u>	Ubicación: <u>N 18° 11.168"</u>	<u>W 066° 18.371'</u>
<b>CARACTERISTICAS DEL CULTIVO</b>		
Área sembrada: <u>3 cuerdas entre las 2</u>		
Fenología: <input checked="" type="checkbox"/> Vegetativo	<input type="checkbox"/> Yemas	<input type="checkbox"/> Tubérculo
Origen de la semilla: <input type="checkbox"/> Comprada	<input checked="" type="checkbox"/> Local	
Preparación del predio: <u>Bancos surcados</u>		
<input checked="" type="checkbox"/> Estacado	<input type="checkbox"/> No Estacado	
Densidad del follaje: <u>4 pulgadas</u>		
Especies muestreadas: <u>D. rotundata</u>		
Fecha de siembra: <u>Enero-Marzo</u>	Fecha de cosecha: <u>Oct - Marzo</u>	
Riego: <u>Natural</u>		
Fertilización: <u>8-8-12</u>		
Fungicidas: <u>Quados</u>		
Comentarios del Agricultor: _____		

Comentarios del Investigador:

Sintomatología: Necrosis, manchas foliares

Porcentaje aproximado de severidad: Nivel 2 de severidad

Muestras colectadas: 2-4 muestras de los cultivos Guinea y Colombiano

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE  
MAYAGUEZ  
65 P.O. BOX 9000  
Mayaguez, PR 00681-9000  
Colegio de Ciencias Agrícolas  
Departamento de Cultivos y Ciencias  
Agroambientales



Fecha: 12-Oct-2013  
ID Proyecto: Z-FIDA 22  
Investigador: Stephane Fustes  
Localización: Pa. Cayaguas  
San Lorenzo  
Agricultor: Angel Montañez

INFORMACION DE LA ESPECIE

Nombre común: Rotonda Guine Negro Nombre científico: D. rotundata  
Nombre común: Colombiano Nombre científico: D. rotundata  
Nombre común: \_\_\_\_\_ Nombre científico: \_\_\_\_\_

DATOS DE LOCALIZACION

Fotos: Desde: \_\_\_\_\_ Hasta: \_\_\_\_\_  
Distancia: \_\_\_\_\_  
Latitud: \_\_\_\_\_ Longitud: 39.6 mi Elevación: 850 ft  
Temperatura: 89° F Ubicación: N 18° 11.168'  
W 066° 18.379'

CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

Área sembrada: 1 cuerda  
Fenología:  Vegetativo  Yemas  Tubérculo  
Origen de la semilla:  Comprada  Local  
Preparación del predio: Cartera, banco  
 Estacado  No Estacado  
Densidad del follaje: 4 pulgadas, en bancos  
Especies muestreadas: D. rotundata  
Fecha de siembra: Inicio Marzo Fecha de cosecha: Fin  
Riego: Natural  
Fertilización: 8-8-2  
Fungicidas: Quinosis  
Comentarios del Agricultor: \_\_\_\_\_

of 20

Comentarios del Investigador: 20 Años en barbecho

Sintomatología: Nanchas necroticas, necrosis  
en los margenes

Porciento aproximado de severidad: 5% o menos (Nivel 2)

Muestras colectadas: 2-4 muestras del cultivar  
Guinea

A-2. Fincas de Utuado.

<b>UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO</b> <b>RECINTO UNIVERSITARIO DE</b> <b>MAYAGUEZ</b> 65 P.O. BOX 9000 Mayaguez, PR 00681-9000 Colegio de Ciencias Agrícolas Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales		Fecha: <u>7-nov-2013</u> ID Proyecto: <u>Z-FIDA 22</u> Investigador: <u>Stephanie Fuentes</u> Localización: <u>Utuado</u> Agricultor: <u>Mariano Afanador</u>
<b>INFORMACION DE LA ESPECIE</b>		
Nombre común: _____	Nombre científico: _____	
Nombre común: <u>Flondo</u>	Nombre científico: <u>D. alata</u>	
Nombre común: <u>Guinea</u>	Nombre científico: <u>D. rotundata</u>	
<b>DATOS DE LOCALIZACION</b>		
Fotos: Desde: _____ Hasta: _____		
Latitud: <sup>Distance</sup> <u>8.0 ft</u>	Longitud: _____	Elevación: <u>1821 ft</u>
Temperatura: <u>87° F</u>	Ubicación: <u>N 18° 16.255'</u>	<u>W 066° 44.908'</u>
<b>CARACTERISTICAS DEL CULTIVO</b>		
Área sembrada: <u>100 cerros</u>		
Fenología: <input checked="" type="checkbox"/> Vegetativo	<input type="checkbox"/> Yemas	<input type="checkbox"/> Tubérculo
Origen de la semilla: <input type="checkbox"/> Comprada	<input checked="" type="checkbox"/> Local	
Preparación del predio: <u>Cerros, 3 pies entre y 2 semillas x cerro</u>		
<input checked="" type="checkbox"/> Estacado	<input checked="" type="checkbox"/> No Estacado	
Densidad del follaje: <u>3. pies</u>		
Especies muestreadas: <u>D. rotundata, D. alata</u>		
Fecha de siembra: <u>Nov →</u>	Fecha de cosecha: <u>Agosto</u>	
Riego: <u>Natural</u>		
Fertilización: <u>20-10-5</u>		
Fungicidas: <u>Ninguno</u>		
Comentarios del Agricultor: _____		

Comentarios del Investigador: NO era una finca  
comercial.

Sintomatología: Necrosis, Manchas foliares

Porcentaje aproximado de severidad: Nivel 2 de severidad.

Muestras colectadas: 2 a 3 muestras por  
especie de rama.

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE  
MAYAGUEZ  
65 P.O. BOX 9000  
Mayaguez, PR 00681-9000  
Colegio de Ciencias Agrícolas  
Departamento de Cultivos y Ciencias  
Agroambientales



Fecha: 7-nov-2013  
ID Proyecto: Z-FIDA 22  
Investigador: Stephanie Fuentes  
Localización: Uturodo  
Agricultor: Hernan de Jesus

#### INFORMACION DE LA ESPECIE

Nombre común: \_\_\_\_\_ Nombre científico: \_\_\_\_\_

Nombre común: \_\_\_\_\_ Nombre científico: \_\_\_\_\_

Nombre común: Habanero (Guineo) Nombre científico: D. rotundata

#### DATOS DE LOCALIZACION

Fotos: Desde: \_\_\_\_\_ Hasta: \_\_\_\_\_

Distancia  
Latitud: Longitud: 0.6 mi Elevación: 1689 ft

Ubicación:  
Temperatura: N 18° 16.142, W 066° 45.482 Temp: 87°F

#### CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

Área sembrada: \_\_\_\_\_

Fenología:  Vegetativo  Yemas  Tubérculo

Origen de la semilla:  Comprada  Local

Preparación del predio: 3,500 cerones, 3 semillas x ceron

Estacado  No Estacado

Densidad del follaje: 4 pies entre cerones

Especies muestreadas: \_\_\_\_\_

Fecha de <sup>cosecha</sup> siembra: Diciembre Fecha de <sup>siembra</sup> cosecha: Marzo-Abril

Riego: Natural

Fertilización: 10-5-20

Fungicidas: Sulfato de Cobre

Comentarios del Agricultor: \_\_\_\_\_

Comentarios del Investigador: NO realizaba  
limpieza de malezas.

Sintomatología: Manchas necroticas, necrosis  
marginal

Porcentaje aproximado de severidad: Nivel 3 de severidad

Muestras colectadas: 2-4 muestras de cv.  
Guinea

A-3. Fincas de Barranquitas

<b>UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO</b> <b>RECINTO UNIVERSITARIO DE</b> <b>MAYAGUEZ</b> 65 P.O. BOX 9000 Mayaguez, PR 00681-9000 Colegio de Ciencias Agrícolas Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales		Fecha: <u>19-09-13</u> ID Proyecto: <u>Z-FIDA 22</u> Investigador: <u>Stephanie Fuentes</u> Localización: <u>Barranquitas</u> Agricultor: <u>Andrés De Jesús</u> <u>787-310-2884</u>
<b>INFORMACION DE LA ESPECIE</b>		
Nombre común: <u>Guinea</u> Nombre científico: <u>D. rotundata</u>		
Nombre común: _____ Nombre científico: _____		
Nombre común: _____ Nombre científico: _____		
<b>DATOS DE LOCALIZACION</b>		
Fotos: Desde: _____ Hasta: _____		
Distancia: <u>27.9 m</u> Elevación: <u>1991 ft</u>		
Temperatura: <u>80° F</u> Ubicación: <u>N 18° 13.809'</u> <u>W 06° 19.523'</u>		
<b>CARACTERISTICAS DEL CULTIVO</b>		
Área sembrada: <u>1/2 cuerda</u>		
Fenología: <input checked="" type="checkbox"/> Vegetativo <input type="checkbox"/> Yemas <input type="checkbox"/> Tubérculo		
Origen de la semilla: <input type="checkbox"/> Comprada <input checked="" type="checkbox"/> Local		
Preparación del predio: <u>Bancos</u>		
<input checked="" type="checkbox"/> Estacado <input type="checkbox"/> No Estacado		
Densidad del follaje: <u>2-3 pies</u>		
Especies muestreadas: <u>D. rotundata</u>		
Fecha de siembra: <u>enero-marzo</u> Fecha de cosecha: <u>nov-diciembre</u>		
Riego: <u>Natural</u>		
Fertilización: _____		
Fungicidas: _____		
Comentarios del Agricultor: _____		

Comentarios del Investigador: Sembra sin limpieza  
de mazorcas, estacas pequeñas

Sintomatología: Necrosis y manchas  
foliares

Porcentaje aproximado de severidad: Nivel 3 de severidad

Muestras colectadas: Se colectaron de 2-4  
muestras de Guinea.

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE  
MAYAGUEZ  
65 P.O. BOX 9000  
Mayaguez, PR 00681-9000  
Colegio de Ciencias Agrícolas  
Departamento de Cultivos y Ciencias  
Agroambientales



Fecha: 19-9-13

ID Proyecto: Z-EIDA 22

Investigador: Stephanie Fuentes

Localización: Barranquitas

Agricultor: Efrain Zayas

INFORMACION DE LA ESPECIE

Nombre común: Habanero Nombre científico: D. rotundata

Nombre común: \_\_\_\_\_ Nombre científico: \_\_\_\_\_

Nombre común: \_\_\_\_\_ Nombre científico: \_\_\_\_\_

DATOS DE LOCALIZACION

Fotos: Desde: \_\_\_\_\_ Hasta: \_\_\_\_\_

Distancia: \_\_\_\_\_  
Latitud: Longitud: 29.3 mi Elevación: 1971 ft

Temperatura: 80° F Ubicación: N 18° 11.571'  
W 066° 18.618'

CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

Área sembrada: 2 1/2 cuerdas

Fenología:  Vegetativo  Yemas  Tubérculo

Origen de la semilla:  Comprada  Local

Preparación del predio: montculos hileras/cerones

Estacado  No Estacado

Densidad del follaje: 2 pies entre plantas, 4 entre hileras

Especies muestreadas: D. rotundata

Fecha de siembra: Enero 13 Fecha de cosecha: oct-dic

Riego: Natural

Fertilización: Elemento tres

Fungicidas: Bidate

Comentarios del Agricultor: seco, no broto semilla

Comentarios del Investigador: Perdido varias cuerdas  
por enfermedades foliares: Cultivar Mapuey  
con síntomas mayormente de Virus.

Sintomatología: Manchitas necróticas

Porcentaje aproximado de severidad: Nivel 3 (D. rotundata) y Nivel 5 (D. alata)

Muestras colectadas: Se colectaron de 2-4 muestras  
de Florido, Guinea y Mapuey.

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE  
MAYAGUEZ  
65 P.O. BOX 9000  
Mayaguez, PR 00681-9000  
Colegio de Ciencias Agrícolas  
Departamento de Cultivos y Ciencias  
Agroambientales



Fecha: 19-9-13  
ID Proyecto: Z-FIDA 22  
Investigador: Stephanie Fuenty  
Localización: Barranquitas  
Agricultor: Roberto Sanchez

INFORMACION DE LA ESPECIE

Nombre común: Florido Nombre científico: D. alata 20% 1 cuerda  
Nombre común: Guinea Nombre científico: D. rotundata 4 cuerdas  
Nombre común: \_\_\_\_\_ Nombre científico: \_\_\_\_\_

DATOS DE LOCALIZACION

Fotos: Desde: \_\_\_\_\_ Hasta: \_\_\_\_\_  
Distancia: \_\_\_\_\_  
Latitud: Longitud: 27.9 mi Elevación: 1991 ft  
Temperatura: 80°F Ubicación: N 18° 13.809'  
W 066° 19.523'

CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

Área sembrada: 1 cuerda (Florido), 4 cuerdas (Guinea)

Fenología:  Vegetativo  Yemas  Tubérculo

Origen de la semilla:  Comprada  Local Quebradillos

Preparación del predio: bancos

Estacado  No Estacado

Densidad del follaje: 2 pres entre plantas, 4/bancos

Especies muestreadas: 2

Fecha de siembra: Marzo Fecha de cosecha: Noviembre

Riego: Natural

Fertilización: Cal (no la usó esta siembra), 15-5-15

Fungicidas: Quadris (2 cada 15d), Vidata (semilla)

Comentarios del Agricultor: Candelilla en habanero

Comentarios del Investigador:

Sintomatología: Candelilla, virus, manchas  
necroticas.

Porcentaje aproximado de severidad: a los 3 meses comienzan los  
sintomas (Nivel 4) en ambas especies.

Muestras colectadas:

2-4 muestras de av. Guinea y Florido

A-4. Finca de Aguada.

<p><b>UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO</b>  <b>RECINTO UNIVERSITARIO DE</b>  <b>MAYAGUEZ</b>          65 P.O. BOX 9000          Mayaguez, PR 00681-9000          Colegio de Ciencias Agrícolas          Departamento de Cultivos y Ciencias          Agroambientales</p>		<p>Fecha: <u>3-10-13</u>          ID Proyecto: <u>Z-FIDA 22</u>          Investigador: <u>Stephanie Fuertes</u>          Localización: <u>Aguada</u>          Agricultor: <u>Edwin Román</u>  <u>787.382.6963</u></p>
<p>INFORMACION DE LA ESPECIE</p>		
<p>Nombre común: <u>Habanero</u> Nombre científico: <u>D. rotundata</u></p>		
<p>Nombre común: <u>Florido</u> Nombre científico: <u>D. alata</u></p>		
<p>Nombre común: _____ Nombre científico: _____</p>		
<p>DATOS DE LOCALIZACION</p>		
<p>Fotos: Desde: _____ Hasta: _____</p>		
<p>Latitud: Longitud: <u>67.15T W</u> Elevación: <u>40 ft</u> <u>Latitud: 18.381° N</u></p>		
<p>Temperatura: <u>90° F</u></p>		
<p>CARACTERISTICAS DEL CULTIVO</p>		
<p>Área sembrada: <u>4 cuerdas, 3 florido</u></p>		
<p>Fenología: <input checked="" type="checkbox"/> Vegetativo <input type="checkbox"/> Yemas <input type="checkbox"/> Tubérculo</p>		
<p>Origen de la semilla: <input type="checkbox"/> Comprada <input checked="" type="checkbox"/> Local <u>Gros agricultores</u></p>		
<p>Preparación del predio: <u>con banillas de cost. En bancos</u></p>		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Estacado <input type="checkbox"/> No Estacado</p>		
<p>Densidad del follaje: <u>4-5 pies entre hileras</u></p>		
<p>Especies muestreadas: <u>Alata y Rotundata</u></p>		
<p>_____</p>		
<p>Fecha de siembra: <u>Desde Enero</u> <sup>mayo (florido)</sup> Fecha de cosecha: <u>Oct</u></p>		
<p>Riego: <u>Natural</u></p>		
<p>Fertilización: <u>15-5-10, 10-5-20, 2 x hoja de triple 20</u></p>		
<p>Fungicidas: <u>Quadris, Bumper Agua con vel.</u></p>		
<p>Comentarios del Agricultor: _____</p>		

Comentarios del Investigador: Siembra de Aunsa  
muy bien cuidada.

Sintomatología: Manchas necróticas, necrosis

Porcentaje aproximado de severidad: Nivel 1 (D. rotundata) y Nivel 4 (D. alata)

Muestras colectadas: 2-4 muestras del cv. Florido  
y Aunsa

A-5. Fincas de Moca.

<b>UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO</b> <b>RECINTO UNIVERSITARIO DE</b> <b>MAYAGUEZ</b> 65 P.O. BOX 9000 Mayaguez, PR 00681-9000 Colegio de Ciencias Agrícolas Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales		Fecha: <u>24-6-13</u> ID Proyecto: <u>Z-FIDA 22</u> Investigador: <u>Stephanie Fuentes</u> Localización: <u>Moca, Bo. Beltran</u> Agricultor: <u>Augusto Cortés</u>
<b>INFORMACION DE LA ESPECIE</b>		
Nombre común: <u>Florido</u> Nombre científico: <u>D. alata</u>		
Nombre común: <u>Guinea (Habonero)</u> Nombre científico: <u>D. rotundata</u>		
Nombre común: _____ Nombre científico: _____		
<b>DATOS DE LOCALIZACION</b>		
Fotos: Desde: <u>390</u> Hasta: _____		
Distancia: <u>20.6 mi</u> Elevación: <u>494 ft.</u>		
Temperatura: <u>87.3° F</u> Ubicación: <u>N 18° 19.767'</u> <u>W 067° 03.365'</u>		
<b>CARACTERISTICAS DEL CULTIVO</b>		
Área sembrada: <u>1 1/2 cuerda</u>		
Fenología: <input checked="" type="checkbox"/> Vegetativo <input type="checkbox"/> Yemas <input type="checkbox"/> Tubérculo		
Origen de la semilla: <input type="checkbox"/> Comprada <input checked="" type="checkbox"/> Local		
Preparación del predio: <u>En cerones</u>		
<input checked="" type="checkbox"/> Estacado <input type="checkbox"/> No Estacado		
Densidad del follaje: <u>≈ 3 pies x p ceron</u>		
Especies muestreadas: <u>D. Alata, D. rotundata</u>		
Fecha de siembra: <u>Enero</u> Fecha de cosecha: <u>oct - nov.</u>		
Riego: <u>Natural</u>		
Fertilización: <u>20-20 foliar, abono 12-12-15</u>		
Fungicidas: <u>solo yerbicida gramazon</u>		
Comentarios del Agricultor: _____		

Comentarios del Investigador: El ñame Florido (*D. alata*) se deteriora demasiado rapido (necrosis extensa).

Sintomatología: Necrosis foliar, manchas necroticas.

Por ciento aproximado de severidad: <sup>Nivel 1</sup> En *D. rotundata* (1 = 20% daño)  
nivel 5 = *D. alata* (5 = 91.100% de daño)  
Muestras colectadas: se colectaron muestras de Florido con diferentes sintomas.

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE  
MAYAGUEZ  
65 P.O. BOX 9000  
Mayaguez, PR 00681-9000  
Colegio de Ciencias Agrícolas  
Departamento de Cultivos y Ciencias  
Agroambientales



Fecha: 26-06-13

ID Proyecto: Z-FIDA 22

Investigador: Stephanie Fuentes

Localización: Moca, Pkta Alta

Agricultor: Carlos Lopez

INFORMACION DE LA ESPECIE

Nombre común: Guinea Nombre científico: D. rotundata

Nombre común: Florida Nombre científico: D. abata

Nombre común: Diamante Nombre científico: D. abata

DATOS DE LOCALIZACION

Fotos: Desde: 382 Hasta: \_\_\_\_\_

Latitud: <sup>Distancia</sup> Longitud: 23.9mi Elevación: 350 ft

Temperatura: 83.8° F Ubicación: N 18° 27.777'  
W 067° 03.092'

CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

Área sembrada: 3 cuerdos, cada uno

Fenología:  Vegetativo  Yemas  Tubérculo

Origen de la semilla:  Comprada Diamante  Local otras

Preparación del predio: Cerros

Estacado  No Estacado

Densidad del follaje: aprox. 3 pies entre cerros

Especies muestreadas: Guinea - D. rotundata

Fecha de siembra: Febrero Fecha de cosecha: Sept - Oct.

Riego: Natural

Fertilización: 12-5-15, 1 aplicación

Fungicidas: Quadris, Lanate

Comentarios del Agricultor: gusanos en el rame, diásmol

Comentarios del Investigador:

Sintomatología: Necrosis bordes de la hojas,  
manchas necroticas

Porcentaje aproximado de severidad: Nivel 1

Muestras colectadas: 2-4 muestras de cv. Guinea

A-6. Fincas de San Sebastián.

<b>UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO</b> <b>RECINTO UNIVERSITARIO DE</b> <b>MAYAGUEZ</b> 65 P.O. BOX 9000 Mayaguez, PR 00681-9000 Colegio de Ciencias Agrícolas Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales		Fecha: <u>12-6-13</u> ID Proyecto: <u>Z-FIDA 22</u> Investigador: <u>Stephanie Fuentes</u> Localización: <u>Bo. Sanador, San Sebastián (Tomau)</u>
<b>INFORMACION DE LA ESPECIE</b>		
Nombre común: <u>Guinea Negro Colombiano (35W)</u> Nombre científico: <u>Dioscorca rotundata</u>		
<b>DATOS DE LOCALIZACION</b>		
Fotos: Desde: <u>353</u> Hasta: <u>364</u>		
Distancia: <u>19.8 mi</u> Elevación: <u>4160</u>		
Temperatura: <u>90°F</u> Ubicación: <u>N 18° 19.143'</u> <u>W 067° 02.763'</u>		
<b>CARACTERISTICAS DEL CULTIVO</b>		
Área sembrada: <u>18 cuerdas sembradas</u>		
Fenología: <input checked="" type="checkbox"/> Vegetativo <input type="checkbox"/> Yemas <input type="checkbox"/> Tubérculo		
Origen de la semilla: <input checked="" type="checkbox"/> Comprada <u>av. Florido</u> <input checked="" type="checkbox"/> Local		
Preparación del predio: <u>En cerones</u>		
<input checked="" type="checkbox"/> Estacado <input type="checkbox"/> No Estacado		
Densidad del follaje: <u>4-5 pcs</u>		
Especies sembradas: <u>D. alata y D. rotundata</u>		
Fecha de siembra: <u>Enero</u>		
Riego: <u>Natural</u>		
Fertilización: <u>15-5-10 3, Mg y elementos menores</u>		
Fungicidas: <u>Bravo 500, Aband y Quadris</u>		
Comentarios del Agricultor: <u>Jomar Ramos. Tiene semilla de Florido comprada de Costa Rica, brotando ahora como 2 cuerdas (pic 367). G. negro sembrado en dic. (~15% dano en la semilla).</u>		

3 años sembrando florido.

Comentarios del Investigador:

Sintomatología: Manchas necróticas, necrosis  
marginal

Porcentaje aproximado de severidad: Nivel 2 de severidad

Muestras colectadas: 2-4 muestras av. Colombiano  
Guinea Negro.

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE  
MAYAGUEZ

65 P.O. BOX 9000  
Mayaguez, PR 00681-9000  
Colegio de Ciencias Agrícolas  
Departamento de Cultivos y Ciencias  
Agroambientales



Fecha: 12-6-13

ID Proyecto: Z-FIDA 22

Investigador: Stephanie Fuentes

Localización: Ba. Sarcador  
San Sebastián  
(Pedro)

INFORMACION DE LA ESPECIE

Nombre común: Habanero (Guineo) Nombre científico: D. rotundata

DATOS DE LOCALIZACION

Fotos: Desde: 320 Hasta: 348

Distancia: 19.6 mi Elevación: 591 ft

Temperatura: 90°F Ubicación: N 18° 18.912'  
W 067° 02.367'

CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

Área sembrada: 5 cuerdas, 70 total

Fenología:  Vegetativo  Yemas  Tubérculo

Origen de la semilla:  Comprada  Local Del mismo agricultor

Preparación del predio: En <sup>Cerones</sup> montículos (practica cultural) 4-5 pies uno  
del otro

Estacado  No Estacado

Densidad del follaje: 4-5 pies

Especies sembradas: D. rotundata

C. negro central de Colombia (5% chón de  
semilla)

Fecha de siembra: Marzo - Abril

Riego: Natural

Fertilización: 15-5-10 3, Mg y elementos menores

Fungicidas: Bravo 500, Abound y Quadris

Comentarios del Agricultor: Israel Ramos Lopez

Israel Ramos - 3 años sembrando florido.  
Foto: 356 Colombiana  
- semilla florido comprada de Costa Rica -

Cosecha de 80-90 quintal .

Se cosecha de sept. a oct. Una vez lo cosechan lo capan. De dic. a enero se seca. Se siembra 2 años en el mismo sitio. Sep - Enero

Comentarios del Investigador: 3 a 4 semillas x cada estaca .

Se vende a Selectos (supermercados), intermediarios, Costos mayores la prep. de montículos. <sup>Para la semilla no</sup> utiliza nada solo Cal .

Sintomatología: Virus, Necrosis foliar.

Porcentaje aproximado de severidad: Nivel 2

Muestras colectadas: muestras de auna, follaje y tallo.

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE  
MAYAGUEZ  
65 P.O. BOX 9000  
Mayaguez, PR 00681-9000  
Colegio de Ciencias Agrícolas  
Departamento de Cultivos y Ciencias  
Agroambientales



Fecha: 12-0-13

ID Proyecto: Z-FIDA 22

Investigador: Stephane Fuentes

Localización: S. Sebastian  
(Israel)

INFORMACION DE LA ESPECIE

Nombre común: Habanero Nombre científico: D. rotundata

DATOS DE LOCALIZACION

Fotos: Desde: 3166 Hasta: 370

Distancia: 19.8 mi Elevación: 462 ft

Temperatura: 90°F Ubicación: N 18° 19.144'  
W 067° 02.759'

CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

Área sembrada: 12 cuerdas

Fenología:  Vegetativo  Yemas  Tubérculo

Origen de la semilla:  Comprada  Local

Preparación del predio: Cerdos

Estacado  No Estacado

Densidad del follaje: 2 pies

Especies sembradas: D. rotundata (Guinea)

Fecha de siembra: Enero - Feb 2013

Riego: Natural

Fertilización: 15-5-10 3

Fungicidas: Bravo, A veces Abund

Comentarios del Agricultor: Pedro Lebron

Dano por pudrición de tallo y semilla.  
Ha perdido varias plantas por esto.

Comentarios del Investigador: Mucha erosión en el suelo

Sintomatología: Marchitez vascular y necrosis  
en semilla y hojas. Posiblemente falta  
de magnesio o virosis. Se observó más <sup>en las</sup> hojas <sup>adultas</sup>

Porcentaje aproximado de severidad: 25% necrosis foliar

Muestras colectadas: <sup>(Nivel 2)</sup> hojas, tallos, semilla.

2-4 muestras cv. Guinea y A. negro  
Colombiano.

**Apéndice B**  
Medios de Cultivo

B-1. Medio PDA (Agar de Papa Dextrosa)

<b>- Agar de Papa Dextrosa</b>	.....	<b>39g</b>
<b>-Agua destilada</b>	.....	1 L

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

B-2. Medio NA (Nutrient Agar)

<b>-Agar Nutritivo</b>	.....	<b>23g</b>
<b>-Agua destilada</b>	.....	1 L

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

B-3. Medio GBA (Agar de Habichuelas Tiernas)

<b>-Habichuelas tiernas</b>	.....	<b>14 onz</b>
<b>-Agar en polvo</b>	.....	20g
<b>-Agua destilada</b>	.....	1 L

Suspender las 14 onz de habichuelas tiernas en un procesador de alimentos y añadir 200 mL de agua destilada. Vertir 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.

B-4. Medio PDB (Caldo de Papa Dextrosa)

<b>-Caldo de Papa Dextrosa</b>	.....	<b>24g</b>
<b>-Agua destilada</b>	.....	1 L

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

**Apéndice C**  
Códigos de Aislados obtenidos

C-1. Códigos de aislados obtenidos dentro de la Colección.

Aislados obtenidos dentro de las variedades de *D. alata*.

<b>Variedad<sup>1</sup></b>	<b>Aislado<sup>2</sup></b>	<b>Código<sup>3</sup></b>
1	PI 15587 1a	G11A
1	PI 15587 1b	G11B
1	PI 15587 2a	G12A
1	PI 15587 2b	G12B
1	PI 15587 2c	G12C
1	PI 15587 2d	G12D
1	PI 15587 3a	G13A
1	PI 15587 3b	G13B
1	PI 15587 3c	G13C
1	PI 15587 4a	G14A
1	PI 15587 4b	G14B
1	PI 15587 4c	G14C
1	PI 15587 4d	G14D
3	PI 15567 1a	G31A
3	PI 15567 1b	G31B
3	PI 15567 2	G32
3	PI 15567 3	G33
4	Del Monte 1	G41
4	Del Monte 2a	G42A
4	Del Monte 2b	G42B
4	Del Monte 2c	G42C
4	Del Monte 3a	G43A
4	Del Monte 3b	G43B
6	Forastero 1a	G61A
6	Forastero 1b	G61B
6	Forastero 2a	G62A
6	Forastero 2b	G62B
6	Forastero 3a	G63A
6	Forastero 3b	G63B
6	Forastero3c	G63C
7	Gunung 1a	G71A
7	Gunung 1b	G71B
7	Gunung 2a	G72A
7	Gunung 2b	G72B
7	Gunung 2c	G72C

<sup>1</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame *D. alata*.

<sup>2</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>3</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde G= Colección de germoplasma de ñame 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos.

<b>Variedad<sup>1</sup></b>	<b>Aislado<sup>2</sup></b>	<b>Código<sup>3</sup></b>
7	Gunung 3a	G73A
7	Gunung 3b	G73B
7	Gunung 3c	G73C
7	Gunung 3d	G73D
8	Diamantes 1	G81
8	Diamantes 2a	G82A
8	Diamantes 2b	G82B
8	Diamantes 2c.1	G82C.1
8	Diamantes 2c.2	G82C.2
8	Diamantes 3	G83
10	Binugas 1	G101
10	Binugas 2a	G102A
10	Binugas 2b	G102B
10	Binugas 3	G103
11	Kabusach 1a	G111A
11	Kabusach 1b	G111B
11	Kabusach 1c	G111C
11	Kabusach 2	G112
11	Kabusach 3a	G113A
11	Kabusach 3b	G113B
11	Kabusach 4a	G114A
11	Kabusach 4b	G114B
11	Kabusach 4c	G114C
14	Purmay 1a	G141A
14	Purmay 1b	G141B
14	Purmay 1c.1	G141C.1
14	Purmay 1c.2	G141C.2
14	Purmay 2a	G142A
14	Purmay 2b	G142B
14	Purmay 2c	G142C
14	Purmay 3a	G143A
14	Purmay 3b	G143B
15	Kinabayo 1a	G151A
15	Kinabayo 1b	G151B
15	Kinabayo 1c	G151C
15	Kinabayo 2a	G152A
15	Kinabayo 2b	G152B
15	Kinabayo 2c	G152C
15	Kinabayo 3a	G153A
15	Kinabayo 3b	G153B

<sup>1</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame *D. alata*.

<sup>2</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>3</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde G= Colección de germoplasma de ñame 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos.

Aislados obtenidos dentro de las variedades de *D. esculenta*.

<b>Variedad<sup>1</sup></b>	<b>Aislado<sup>2</sup></b>	<b>Código<sup>3</sup></b>
5	Doli 1a	G51A
5	Doli 1b	G51B
5	Doli 1c	G51C
5	Doli 2a	G52A
5	Doli 2b	G52B
5	Doli 2c	G52C
12	Muni 1a	G121A
12	Muni 1b	G121B
12	Muni 1c	G121C
12	Muni 2a	G122A
12	Muni 2b	G122B
12	Muni 2c	G122C
13	PI 13345 1a	G131A
13	PI 13345 1b.1	G131B.1
13	PI 13345 1b.2	G131B.2
13	PI 13345 2a	G132A
13	PI 13345 2b	G132B
16	Seti 1a	G161A
16	Seti 1b	G161B
16	Seti 1c	G161C
16	Seti 2a	G162A
16	Seti 2b	G162B
17	PI 11346 1a.1	G171A.1
17	PI 11346 1a.2	G171A.2
17	PI 11346 1b	G171B
17	PI 11346 1c	G171C
17	PI 11346 2a	G172A
17	PI 11346 2b	G172B
17	PI 11346 2c	G172C
20	PI 13347 1a.1	G201A.1
20	PI 13347 1a.2	G201A.2
20	PI 13347 1b	G201B
20	PI 13347 2a	G202A
20	PI 13347 2b	G202B
20	PI 13347 2c	G202B
21	Beti 1a	G211A
21	Beti 1b	G211B
21	Beti 2a	G212A
21	Beti 2b	G212B

<sup>1</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame *D. esculenta*.

<sup>2</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>3</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde G= Colección de germoplasma de ñame 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos.

<b>Variedad<sup>1</sup></b>	<b>Aislado<sup>2</sup></b>	<b>Código<sup>3</sup></b>
21	Beti 3a	G213A
21	Beti 3b	G213B
21	Beti 4	G214
22	Kombi 1	G221
22	Kombi 2	G222
22	Kombi 3a	G223A
22	Kombi 3b	G223B

<sup>1</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame *D. esculenta*.

<sup>2</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>3</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde G= Colección de germoplasma de ñame 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos.

Aislados obtenidos dentro de las variedades de *D. rotundata*.

<b>Variedad<sup>1</sup></b>	<b>Aislado<sup>2</sup></b>	<b>Código<sup>3</sup></b>
2	Colombiano 1	G21
2	Colombiano 2a	G22A
2	Colombiano 2b	G22B
2	Colombiano 2c	G22C
2	Colombiano 2d	G22D
2	Colombiano 3a	G23A
2	Colombiano 3b	G23B
18	G. negro 1	G181
18	G. negro 2a	G182A
18	G. negro 2b	G182B
18	G. negro 3	G183
19	Geño 1	G191
19	Geño 2	G192
19	Geño 3a	G193A
19	Geño 3b	G193B

<sup>1</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame *D. rotundata*.

<sup>2</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>3</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde G= Colección de germoplasma de ñame 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos.

Aislados obtenidos dentro de la variedad de *D. trifida*.

<b>Variedad<sup>1</sup></b>	<b>Aislado<sup>2</sup></b>	<b>Código<sup>3</sup></b>
9	Mapuey 1a	G91A
9	Mapuey 2a	G92A
9	Mapuey 2b	G92B

<sup>1</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame *D. trifida*.

<sup>2</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>3</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde G= Colección de germoplasma de ñame 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos.

Aislados obtenidos dentro de la variedad de *D. cayenensis*.

<b>Variedad<sup>1</sup></b>	<b>Aislado<sup>2</sup></b>	<b>Código<sup>3</sup></b>
<b>23</b>	PI 15520 1a	G231A
<b>23</b>	PI 15520 1b	G231B
<b>23</b>	PI 15520 2a	G232A
<b>23</b>	PI 15520 2b	G232B
<b>23</b>	PI 15520 2c	G232C
<b>23</b>	PI 15520 3a	G233A
<b>23</b>	PI 15520 3b	G233B
<b>23</b>	PI 15520 3c	G233C

<sup>1</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame *D. cayenensis*.

<sup>2</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>3</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde G= Colección de germoplasma de ñame 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos.

C-2. Códigos de los aislados obtenidos de las fincas.

<b>Finca<sup>1</sup></b>	<b>Pueblo</b>	<b>Variedad<sup>2</sup></b>	<b>Aislado<sup>3</sup></b>	<b>Nuevo codigo<sup>4</sup></b>
<b>Israel</b>	San Sebastian	24	Guinea 1a	F11241A
<b>Israel</b>	San Sebastian	24	Guinea 1b	F11241B
<b>Israel</b>	San Sebastian	24	Guinea 2a	F11242A
<b>Israel</b>	San Sebastian	24	Guinea 2b	F11242B
<b>Israel</b>	San Sebastian	24	Guinea 2c	F11242C
<b>Israel</b>	San Sebastian	24	Guinea 3b	F11243B
<b>Israel</b>	San Sebastian	24	Guinea 3a	F11243A
<b>Israel</b>	San Sebastian	24	Guinea 4a	F11244A
<b>Israel</b>	San Sebastian	24	Guinea 4b	F11244B
<b>Jomar</b>	San Sebastian	18	G. negro 3a	F21183A
<b>Jomar</b>	San Sebastian	18	G. negro 3b	F21183B
<b>Jomar</b>	San Sebastian	18	G. negro 3c	F21183C
<b>Jomar</b>	San Sebastian	18	G. negro 4b	F21184B
<b>Jomar</b>	San Sebastian	18	G. negro 4a	F21184A
<b>Jomar</b>	San Sebastian	18	G. negro 1a	F21181A
<b>Jomar</b>	San Sebastian	18	G. negro 1b	F21181B
<b>Jomar</b>	San Sebastian	18	G. negro 2a	F21182A
<b>Jomar</b>	San Sebastian	18	G. negro 2b	F21182B
<b>Jomar</b>	San Sebastian	2	Colombiano 1a	F2121A
<b>Jomar</b>	San Sebastian	2	Colombiano 1b	F2121B
<b>Jomar</b>	San Sebastian	2	Colombiano 2a	F2122A
<b>Jomar</b>	San Sebastian	2	Colombiano 2b.1	F2122B.1
<b>Jomar</b>	San Sebastian	2	Colombiano 2b.2	F2122B.2
<b>Jomar</b>	San Sebastian	2	Colombiano 3a	F2123A
<b>Jomar</b>	San Sebastian	2	Colombiano 3b	F2123B
<b>Pedro</b>	San Sebastian	24	Guinea 2a	F31242A
<b>Pedro</b>	San Sebastian	24	Guinea 2b	F31242B
<b>Pedro</b>	San Sebastian	24	Guinea 2c	F31242C
<b>Pedro</b>	San Sebastian	24	Guinea 1 tallo	F31241t
<b>Pedro</b>	San Sebastian	24	Guinea 2 tallo	F31242t
<b>Pedro</b>	San Sebastian	24	Guinea 1	F31241
<b>Carlos</b>	Moca	24	Guinea 4a	F42244A
<b>Carlos</b>	Moca	24	Guinea 4b	F42244B
<b>Carlos</b>	Moca	24	Guinea 2a	F42242A
<b>Carlos</b>	Moca	24	Guinea 2b	F42244B
<b>Carlos</b>	Moca	24	Guinea 3a	F42243A
<b>Carlos</b>	Moca	24	Guinea 3b	F42243B

<sup>1</sup> Nombres de propietarios de las diferentes fincas.

<sup>2</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame.

<sup>3</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>4</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde F= Fincas muestreadas 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos.

<b>Finca<sup>1</sup></b>	<b>Pueblo</b>	<b>Variedad<sup>2</sup></b>	<b>Aislado<sup>3</sup></b>	<b>Nuevo codigo<sup>4</sup></b>
<b>Carlos</b>	Moca	24	Guinea 1	F42241
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 1a	F52251A
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 1b	F52251B
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 1c	F52251C
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 2a	F52252A
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 2b	F52252B
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 2c	F52252C
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 2d	F52252D
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 3a	F52253A
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 3b	F52253B
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 3c	F52253C
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 3d	F52253D
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 4a	F52254A
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 4b	F52254B
<b>Augusto</b>	Moca	25	Florido 4c	F52254C
<b>Roberto</b>	Barranquitas	24	Guinea 1a	F65241A
<b>Roberto</b>	Barranquitas	24	Guinea 1b	F65241B
<b>Roberto</b>	Barranquitas	25	Florido 1a.1	F65251A.1
<b>Roberto</b>	Barranquitas	25	Florido 1a.2	F65251A.2
<b>Roberto</b>	Barranquitas	25	Florido 2a	F65252A
<b>Roberto</b>	Barranquitas	25	Florido 2b	F65252B
<b>Efrain</b>	Barranquitas	9	Mapuey 1a	F7591A
<b>Efrain</b>	Barranquitas	25	Florido 1a	F75251A
<b>Efrain</b>	Barranquitas	25	Florido 1b	F75251B
<b>Efrain</b>	Barranquitas	24	Guinea 1a	F75241A
<b>Andres</b>	Barranquitas	24	Guinea 1a.1	F85241A.1
<b>Andres</b>	Barranquitas	24	Guinea 1a.2	F85241A.2
<b>Andres</b>	Barranquitas	24	Guinea 1b	F85241B
<b>Andres</b>	Barranquitas	24	Guinea 1c	F85241C
<b>Andres</b>	Barranquitas	24	Guinea 2a	F85242A
<b>Andres</b>	Barranquitas	24	Guinea 2b	F85242B
<b>Andres</b>	Barranquitas	24	Guinea 2c	F85242C
<b>Edwin</b>	Aguada	24	Guinea 1a	F94241A
<b>Edwin</b>	Aguada	24	Guinea 1b	F94241B
<b>Edwin</b>	Aguada	24	Guinea 2a	F94242A
<b>Edwin</b>	Aguada	24	Guinea 2b	F94242B
<b>Edwin</b>	Aguada	24	Guinea 2c	F94242C
<b>Edwin</b>	Aguada	24	Guinea 3a	F94243A
<b>Edwin</b>	Aguada	24	Guinea 3b	F94243B
<b>Edwin</b>	Aguada	25	Florido 1a	F94251A

<sup>1</sup> Nombres de propietarios de las diferentes fincas.

<sup>2</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame.

<sup>3</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>4</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde F= Fincas muestreadas 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos

<b>Finca<sup>1</sup></b>	<b>Pueblo</b>	<b>Variedad<sup>2</sup></b>	<b>Aislado<sup>3</sup></b>	<b>Nuevo codigo<sup>4</sup></b>
<b>Edwin</b>	Aguada	25	Florido 1b	F94251B
<b>Edwin</b>	Aguada	25	Florido 2a	F94252A
<b>Edwin</b>	Aguada	25	Florido 2b	F94252B
<b>Edwin</b>	Aguada	25	Florido 2c	F94252C
<b>Edwin</b>	Aguada	25	Florido 3a	F94253A
<b>Edwin</b>	Aguada	25	Florido 3b	F94253B
<b>Angel</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 2a	F106242A
<b>Angel</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 2b	F106242B
<b>Angel</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 3a	F106243A
<b>Angel</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 3b	F106243B
<b>Angel</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 1a	F106241A
<b>Angel</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 1b	F106241B
<b>Gilcar</b>	S. Lorenzo	2	Colombiano 1a	F11621A
<b>Gilcar</b>	S. Lorenzo	2	Colombiano 1b	F11621B
<b>Gilcar</b>	S. Lorenzo	2	Colombiano 2	F11622
<b>Gilcar</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 1a	F116241A
<b>Gilcar</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 1b	F116241B
<b>Gilcar</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 2a	F116242A
<b>Gilcar</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 2b	F116242B
<b>Gilcar</b>	S. Lorenzo	24	Guinea 2c	F116242C
<b>Hernan</b>	Utuaado	24	Guinea 1a	F123241A
<b>Hernan</b>	Utuaado	24	Guinea 1b	F123241B
<b>Hernan</b>	Utuaado	24	Guinea 2a	F123242A
<b>Hernan</b>	Utuaado	24	Guinea 2b	F123242B
<b>Hernan</b>	Utuaado	24	Guinea 2c	F123242C
<b>Hernan</b>	Utuaado	24	Guinea 3a	F123243A
<b>Hernan</b>	Utuaado	24	Guinea 3b	F123243B
<b>Hernan</b>	Utuaado	24	Guinea 3c	F123243C
<b>Mariano</b>	Utuaado	24	Guinea 1a	F133241A
<b>Mariano</b>	Utuaado	24	Guinea 1b.1	F133241B.1
<b>Mariano</b>	Utuaado	24	Guinea 1b.2	F133241B.2
<b>Mariano</b>	Utuaado	25	Florido 1a	F133251A
<b>Mariano</b>	Utuaado	25	Florido 1b	F133251B

<sup>1</sup> Nombres de propietarios de las diferentes fincas.

<sup>2</sup> Número asignado a las distintas variedades de ñame.

<sup>3</sup> Número de muestra dentro de cada variedad.

<sup>4</sup> Código asignado de acuerdo a la variedad y aislado, donde F= Fincas muestreadas 2012, más el número asignado a la variedad, el número de muestra (diferentes síntomas, ej. 1, 2 y 3) y el aislado de dicha muestra, donde las letras A, B, C y D, son los diferentes hongos.

**Apéndice D**  
Protocolos utilizados para la identificación molecular

#### D-1. Extracción de ADN

1. Encender baño de María (NESLAB instruments, R134A) a 65°C.
2. Colectar micelio y colocarlo en los tubos de FastPrep.
3. Añadir 400 µL del buffer AP1 y 4 µL de RNAsa a cada tubo.
4. Colocar los tubos en FastPrep para romper el tejido.
5. Incubar a 65°C por 1 hora.
6. Centrifugar por 2 minutos a 13,500 rpm.
7. Colectar 200 µL del sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo.
8. Añadir 130 µL de 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 µL del sobrenadante a una columna translúcida.
14. Añadir 300 µL de 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 µL del 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 60 µL del 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. Añadir 60 µL del buffer AE.
25. Dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.
26. Centrifugar por 1 minuto a 13,500 rpm.
27. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
28. Calcular concentración de ADN.

## D-2. Purificación de ADN del producto de PCR.

1. Unir los dos productos de PCR de cada muestra, debería quedar un total de 40  $\mu$ L de este producto.
2. Rotular las columnas violetas con sus respectivos códigos y añadir 200  $\mu$ L de buffer QG a cada una de estas.
3. Añadir a estas columnas los 40  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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.

### D-3. Purificación de ADN de la gel.

Hacer una gel de electroforesis al 1%, con agarosa Low Melt ( ).

-0.25g de Agarosa

-25 mL del buffer TAE

-3  $\mu$ L de Gel Red luego de calentarlo

1. Añadir a cada fosa 40  $\mu$ L de DNA y 10  $\mu$ L de Loading Dye.
2. Correr la gel a 60 voltios por 60 minutos.
3. Cortar las bandas e identificarlas y colocarlas en un papel fino.
4. Pesar las bandas en una balanza (Scout, SC4014) y colocarlas en un micro tubo de 1.5 mL.
5. Agregar 3 volúmenes de buffer QG dentro del micro tubo con la gel.
6. Colocar el tubo en el baño de María por 10 minutos a 50°C y voltear cada 4 minutos.
7. Sacar tubos del baño de María y colocar un volumen de isopropanol. Mezclar.
8. Colocar 750  $\mu$ L de esta mezcla en las columnas violetas.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por un minuto.
10. Eliminar o que paso a través de la columna y colocar nuevamente el filtro en el mismo tubo. Repetir el paso 7 hasta que ya no filtre más líquido.
11. Añadir 750  $\mu$ L del buffer PE y dejar reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 14,000 rpm por un minuto.
13. Desechar lo que paso a través de la columna.
14. Centrifugar nuevamente a 14,000 rpm por un minuto.
15. Añadir 30  $\mu$ L del buffer EB y dejar reposar por 10 minutos.
16. Centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos.
17. Medir concentración del ADN

## **Apéndice E**

Otros géneros de hongos identificados morfológicamente. Códigos para estos aislados.

E-1. Aislados con identificación morfológica.

---

<b>Aislado</b>	<b>Identificación Morfológica</b>
G22C	<i>Fusarium</i> sp.
G23A	<i>Nigrospora</i> sp.
G51B	<i>Nigrospora</i> sp.
G71B	<i>Botriodiplodia</i> sp.
G72A	<i>Botriodiplodia</i> sp.
G82B	<i>Nigrospora</i> sp.
G82C.2	<i>Nigrospora</i> sp.
G92B	<i>Fusarium</i> sp.
G102A	<i>Phomopsis</i> sp.
G114B	<i>Nigrospora</i> sp.
G114C	<i>Nigrospora</i> sp.
G121A	<i>Botriodiplodia</i> sp.
G121C	<i>Nigrospora</i> sp.
G122B	<i>Fusarium</i> sp.
G161A	<i>Nigrospora</i> sp.
G162A	<i>Nigrospora</i> sp.
G162B	<i>Cladosporium</i> sp.
G171A.1	<i>Cladosporium</i> sp.
G182B	<i>Curvularia</i> sp.
G183	<i>Botriodiplodia</i> sp.
G211A	<i>Botriodiplodia</i> sp.
G211B	<i>Nigrospora</i> sp.
G214	<i>Botriodiplodia</i> sp.
G222	<i>Botriodiplodia</i> sp.
G223A	<i>Botriodiplodia</i> sp.
G231B	<i>Nigrospora</i> sp.
G232C	<i>Fusarium</i> sp.
G233A	<i>Alternaria</i> sp.
G233B	<i>Botriodiplodia</i> sp.
G91A	<i>Nigrospora</i> sp.
G14C	<i>Nigrospora</i> sp.

---

**Apéndice F**  
Análisis estadístico

## F-1. Análisis de varianza

C:\Users\PaxCam\Documents\Steph\CC.IDB2 : 2/20/2015 - 2:05:19 PM - [Version : 10/28/2013]

### Analysis of variance

Variable	N	R <sup>2</sup>	Adj R <sup>2</sup>	CV
Crecimiento	44	0.87	0.75	9.85

### Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	7009.73	21	333.80	7.06	<0.0001
Aislado	7009.73	21	333.80	7.06	<0.0001
Error	1040.00	22	47.27		
Total	8049.73	43			

### Test:Fisher LSD Alpha:=0.05 LSD:=14.25895

Error: 47.2727 df: 22

Aislado	Means	n	S.E.					
F133251A	35.50	2	4.86	A				
F85241C	44.00	2	4.86	A				
F52253A	49.00	2	4.86	A	B			
G81	59.50	2	4.86		B	C		
G73D	60.00	2	4.86		B	C		
F52251A	60.50	2	4.86		B	C	D	
G122A	67.00	2	4.86			C	D	E
F21182A	72.00	2	4.86			C	D	E
G12B	73.50	2	4.86			C	D	E
G153A	74.50	2	4.86				D	E
F11244B	75.50	2	4.86					E
G121B	76.50	2	4.86					E
F52252D	76.50	2	4.86					E
G14B	77.00	2	4.86					E
G12D	77.50	2	4.86					E
G143A	79.00	2	4.86					E
G61B	79.00	2	4.86					E
G42B	79.50	2	4.86					E
G23B	79.50	2	4.86					E
G13A	79.50	2	4.86					E
F11244A	80.00	2	4.86					E
G62A	80.00	2	4.86					E

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0.05$ )

## **Apéndice G**

Secuencias obtenidas de los 22 aislados con cada gen.

G-1. Secuencias de aislados de *Colletotrichum* spp. con el gen de ITS de ADN ribosomal.

>F11244B-ITS (*Colletotrichum ignotum*)

TCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTATAACCCTTTGTG  
AACATACTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCCTCC  
CGCCTCCGGGCGGGTTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACG  
TTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTT  
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATC  
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATG  
CCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTG  
ATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC  
TTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCA  
AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

>G12B ITS1 (*C. gloeosporioides*)

TGACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACC  
TATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCCTCCCGCCTCCG  
GGCGGGTTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTG  
AGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG  
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA  
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCA  
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCCGATGTAGGC  
CCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCT  
CGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGA  
CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

>F52252D ITS (*C. gloeosporioides*)

CTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTG  
TGAACATACTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCCT  
CCCGCCTCCGGGCGGGTTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGA  
CGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGG  
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT  
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCA  
TGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGC  
CGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAA  
CTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTT  
CAAAGGTTGACCTCGGATC

>F133251A ITS (*C. alatae*)

TTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCA  
TACTGAGTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACTATAACTGTTGCTTCGGCG  
GGTGGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCCCGCCCGCCCGGGCGGGTTCGGCGCCCGCC  
GGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAA  
TCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA

TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  
TTGCGCCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAA  
GCTCTGCTTGGCGTTGGGGCCCTACAGCCGATGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA  
CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGG  
ACTCTTGCCGTAAAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA  
CCCGCTGAACTTAAGCATATC

>G12D ITS (*C. siamense*)

TTCTTGGTCCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAG  
CGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACT  
GTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCCTCCCGCCCCGGGCGGGT  
CGGCGCCCAGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTA  
CAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA  
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC  
TTTGAACGCACATTGCGCCCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT  
TTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAA  
GGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTG  
GGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGA  
TCMGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGAGGAA

>G42B ITS (*C. siamense*)

TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCAT  
TACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGG  
GTAGGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCCTCCCGCCCCGGGCGGGTTCGGCGCCCAGCGG  
AGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATC  
AAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG  
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGC  
TCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACC  
CTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGAC  
TCTTGCCGTAAAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACC  
CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

>G62A ITS (*C. fructicola*)

CTTCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTATAACCCTTTG  
TGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCCT  
CCCGCCTCCGGGCGGGTTCGGCGCCCAGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGA  
CGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGG  
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT  
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCAGCATTCTGGCGGGCA  
TGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGC  
TGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAA  
CTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAATTTTC  
CAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

>G73D-ITS (*C. tropicale*)

CTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTG  
TGAACATACTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCT  
CCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGA  
CGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGG  
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT  
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCA  
TGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGC  
TGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAA  
CTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAATTTTCC  
AAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT

>G121B\_ITS (*C. theobromicola*)

CTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTG  
TGAACATACTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCCCCGTGACCCTCCCGGCCT  
CCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAAC  
GACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTT  
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA  
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGG  
CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACA  
GCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGT  
AACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAATTT  
TCAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA  
AGCGGAGGAA

>G143A-ITS (*C. tropicale*)

AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT  
ACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACTATAACTGTTGCTTCGGCGG  
GTAGGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCG  
AGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATC  
AAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG  
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGC  
TCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACC  
CTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGAC  
TCTTGCCGTAAAACCCCAATTTTCAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC  
CCGCTGAACTTAAGCATATGGT

>F11244A\_ITS (*C. siamense*)

TGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACA  
TACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCC  
CCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCT  
TCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC

ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA  
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGT  
TCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGT  
AGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTAC  
GTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGG  
TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA

>F21182A ITS (*C. truncatum*)

CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTACCGCTCATCAACCCTTTGTGA  
ACATACCTTAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGCGTCCCCTAAAAGGACGTCTCCCGG  
CCCTCTCCCGTCCGCGGGTGGGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAAC  
GACGTTTCTTCTGAGTGACACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTT  
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA  
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGG  
CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCTCTACG  
GTTGACGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGT  
AACATTTTCGTCTCGCATTGGGATTCGGAGGGACTCTAGCCGTAAAACCCCCAATTTT  
ACTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

>F52251A ITS (*C. alatae*)

TTGGTGACNGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACAT  
TCCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGAGGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCCCCCGCCG  
GAGGATAAGCAAACCTCTGATTTGACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGGAAATAAT  
CAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCAGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCNAATCTTTGAACGCACA  
TTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAA  
GCTCTGCTTGGAGTTGGGGCCCTACAGCCGATGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA  
CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGG  
ACTCTTGCCGTAAAACCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA  
CCCGCTGAACTTAAGCATATCA

>F52253A ITS (*C. alatae*)

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGATGTTTCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTCT  
GAGTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATAACCTATTCCGGTTGCTTAGGCGGGTG  
GGGTATCCGCGACCCTCCCGGCCGCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGGAG  
GATATCCAAACTATGATTTAACGACGTTTCTTATGAGTGGTACAAGCAAATAATCAA  
AACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC  
GCCCCGACGATTATGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTC  
TGCTTGGCGTTGGGGCCCTACAGCCGATGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCT  
CCCGGAGCCTCCTTTGGGTAGTAAACCGTCCGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTC  
TTACCGTAAAACCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATC

>F85241C ITS (*C. cliviae*)

GGACATATCGAGTTACCGCTCCTTATAACCCTTTGTGAACATAACCCCAAACGTTGC  
CTCGGCGGGCAGCCGGAGCCTAGCTCCGTGCGCCCGGAGCCGCGGTCTCGGCGCGCC

CCACCCGCCGGCGGACCACCAAACCTCTATTTAAACGACGTCTCTTCTGAGTGGCACA  
AGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC  
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT  
GAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTT  
AACCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCCTACGGCTTCCGTAGGCCCCGAAATAC  
AGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATAACCACCTCGCACTGGGA  
TCCGGAGGGACTCCTGCCGTAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCA  
GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAA

>G13A\_ITS (*C. tropicale*)

TTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAAC  
ATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGC  
CCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT  
CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTG  
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT  
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCT  
GTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGAT  
GTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTT  
ACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAACCCCAATTTTCCAAA  
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

>G14B\_ITS (*C. cliviae*)

CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTATCGAGTTACCGCTCCTTATAACCCTTTGT  
GAACATAACCCCAAACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGCCTAGCTCCGTGCCCCG  
AGCCGCCGTCTCGGCGCGCCCCACCCGCCGGCGGACCACCAAACCTCTATTTAAACG  
ACGTCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTG  
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA  
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGC  
ATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCCTACG  
GTTCCGTAGGCCCCGAAATACAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGT  
AACATAACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTAACCCCAATTT  
TCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA  
GG

>G23B\_ITS (*C. fruticola*)

GGTGACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATA  
CCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGCGACCCTCCCGGCCTCCCGCCTC  
CGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTC  
TGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT  
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT  
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTT  
GAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAG  
GCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTACGT

CTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTT  
GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

>G61B\_ITS (*C. cliviae*)

TGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTATCGAGTTACCGCTCCTTATAACCCTTTGTGAA  
CATACCCCAAACGTTGCTTCGGCGGGCAGTCGGAGCCTAGCTCCGTGCCCCGGAGC  
CGCCGTCTCGGCGCGCCCCACCCGCCGGCGGACCACCAAACCTCTATTTAAACGACGT  
CTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTC  
TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA  
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGC  
CTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCCTACGGCTT  
CCGTAGGCCCCGAAATACAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACA  
TACCACCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCA  
AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

>G81\_ITS (*C. aotearoa*)

TGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACA  
TACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCC  
CCCGGGCGGGTTCGGCGCCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCT  
TCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC  
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA  
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGT  
TCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGT  
AGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTAC  
GTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT  
TGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

>G122A\_ITS (*C. karstii*)

TTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAAC  
ATACCTACAACGTTGCTTCGGCGGGTAGGCCGTCCCCTGAAAAGGACGCCTCCCGG  
CCCGGACCGGACCCCCCGCGGGACCCGACCCGGCGCCCCGCCGGAGGATAACCAAAC  
TCTATTGTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGCATAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAC  
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT  
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG  
CATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT  
TGGGGCTCTACGGTCGACGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCC  
TCCTTTGCGTAGTAAACATTTTCGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAA  
AACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT  
AAGCATATCA

>G153A\_ITS (*C. tropicale*)

TGGTGACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACAT  
ACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCC  
CCGGGCGGGTTCGGCGCCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTT

CTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA  
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA  
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTT  
CGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTA  
GGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACG  
TCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTA AAAACCCCAATTTTCCAAAGGTT  
GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

G-2. Secuencias de aislados de *Colletotrichum* spp. con el gen de  $\beta$ -tubulina.

>F52252D-BTUB (*C. gloeosporioides*)

CAACATGCGTGAGATTGTAAGTTGCAGTCCATCACCACGAAATCACAACAACGCCTT  
GCGACGAGTTTATCCGCGCTACCCATGAGCGTACCCCGCTGACATTTTTACCCGACC  
TCTTTGCTCAACAAACCCGCGACGCCTGTCAATCTTCTACGGACTAGTAAGGAATTA  
AAAGGTGTCTGCTGCTTAACCGTCGGCAGGTTTCACAGCCAGACCCGGCCAGGGGGTC  
AGTCTTCATCCGTCAGAGACCATAGCCAGATTGCGGGGCTAACCTCCTAGTGCAGGG  
TAACCCGACCCGGTCTGCCTTCTGGTACGAGACGAGCCCGCGGACGACCCGAAAAT  
ATCATTCTTGCAGGACGGCAGATGTTGACGATGGAATAGGCCAAAACATTTATGGC  
GAGCACGGCCGAGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGCCCTTATCTGTCCACATTGG  
TGGTTGACCGCTAAACTCGAACAGTTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCG  
CATGAGCGTCTACTTCAACGAAGTTTGTACCTTATAGCCCCAAGAGTGCAAGATAA  
ACATATTGACGAGTACTGACCTTCGCTCCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTG  
CCCCGTGCCGTCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGT  
CCTTTCGGTCAGCTCTCACGCCCCGAC

>F133251A-BTUB (*C. alatae*)

GAGATTGTAAGTTGCCATCACCACAATCACAACAACACCTGCGACGCGTTTATCCGC  
CTTGCCCTGAGCGCAACCCACCCGACATTTTTACCCGACTTCCATGCTCACCGAAC  
TCGCGACGCCGTCAACCATCGACTTCTACTCTGGAATGTTTTGCTGACTGCTACTT  
TTCTCTTACAGGTTACCTCCAGACCCGGCCAGTGCCTAAGTCTCCCAAGCCAAAT  
CCAACCGTCTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGGTAACCAGATTGGTGCTGC  
CTTCTGGTACGTGGCGAGACTGCCGACGACCCGGCAATATCATACTGCGAGAACG  
ACAGATGTTGACGGTGGAGTAGGCAAAACATTTCTGGCGAGCATGGCCTCGACAGC  
AATGGAGTGTATGTCATGTCCCTTATCTGGCCACATTGGTGGTTGACGGCTAAACTC  
GAATAGCTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTTTACTTCAA  
CGAAGTTTGTACCTTTTAGCCCCAGAGTGCAAGAAAAACATGTTGACGAGTACTG  
ACCCTCGCTCCACCCAGGCGTCCGGCAACAAGTACGTGCCCGTGCCGTCTCGTC  
GATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTTCGGCCAGCTCTTC  
CGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTGGCCGCAACAACCTGGGCCAAGGGT  
CACTAA

>G12D-BTUB (*C. siamense*)

TGTAAGTTGCAGTCCATCACCACAATCACAACAACGCTTGCAGCGCGTTTATCCGCC  
TTGCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTTTTACCCGACTTCTATGCTCAACAAACC  
GCGACGCCTGTCAATCATCGACGTCCAACCTCTGGAATAATTTGCTGACTGCTGCTTTT  
TTTTGTCTACAGGTTACCTCCAGACCCGGCCAGTGCCTAAGTCTTCCCAAGCCAAA

TCCAACCGCCTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGGTAACCAGATTGGTGCTG  
CCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACACCCGGCGATATATACTTGGCAGGACG  
GCAGATGTTGACGATAGAGTAGGCAAAACATTTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGC  
AATGGAGTGTATGTCATGCCCCTTATCTGGCCACATTGGTGGTTGTCCGCTAAACTC  
GAACAGCTACAACGGCACATCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCA  
ATGAAGTTTGTACCTTATAGCCCCAGAGTGCAAGATAAACATATTGACGAGTACT  
GACCTTCGCTCCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTGCCCCGTGCCGTCTCGT  
CGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCTTTCCGGCCAGCTGTT  
CCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTGCCGGCAACAACCTGGGCCAAGG  
GGTCACT

>G73D-BTUB (*C. tropicale*)

AACATGCGGTGAGATTGTAAGTTGCAGTCCATCACCACAATCACAACAACGCTTGCG  
ACGCGTTTATCCGCCTTGCCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTTTTACCCGACTTCTA  
TGCTCAACAAACCCGCGACGCCTGTCAATCATCGACGTCCAACCTCTGGAATAATTTG  
CTGACTGCTGCTTTTTTTTTGTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTC  
TTCCCAAGCCAAATCCAACCGCCTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGGTAAC  
CAGATTGGTGCTGCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACGACCCGGCGATATATA  
CTTGGCAGGACGGCAGATGTTGACGATAGAGTAGGCAAAACATTTCTGGCGAGCAC  
GGCCTCGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGCCCCTTATCTGGCCACATTGGTGGTTG  
TCCGCTAAACTCGAACAGCTACAACGGCACATCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGA  
GCGTCTACTTCAATGAAGTTTGTACCTTATAGCCCCAGAGTGCAAGATAAACATA  
TTGACGAGTACTGACCTTCGCTCCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTGCCCCG  
TGCCGTCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCTTT  
CGGCCAGCTGTTCCGCCCCGACAACCTTC

>G121B-BTUB (*C. theobromicola*)

AACATGCGTGAGATTGTAAGTTCGATGTCCATCACCACAATCACAACACCACTTGCGA  
CGCGTTTATCCGCTTTGCCCTGAGCGTACCCCGCCGACACTTTCACCCGAGTTCCAT  
GTTACCAAACCCGCGACGCCCGTCAATCCGACCCCCTACTGCGGGATGCTTTGCTG  
ACTGCCGCTTTTCTCTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTAGTCC  
CAAAGCAAATTCAATCGCCTGATTGCAGGGCTAAGGGCTAATCTCTCGCAACAGGG  
TAACCAGATTGGTGCTGCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACGACCGGCAACA  
AACACCACAATTGCGGAGAACGAGAGATGTTGACGATGGAACAGGCAAAACATTTCT  
GGCGAGCACGGCCTTGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGCCCGTTATCTGGCCACAT  
TGATGGATGACCGCTAAACTCGAACAGCTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCG  
AGCGCATGAGCGTCTATTTCAACGAAGTTTGTACCTTATAGCCCCAGAGTGCAAG  
ACAAACATATTGACGAGTACTGACCTTCGCTCCTACCCAGGCTTTCCGGCAACAAGT  
ATGTGCCCCGTGCCGTCTCGTCGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTG  
CCGGTCCTTTTCCGGCCAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGT  
GCCGGCAACAACCTGGGCCAAGGGTCACT

>G143A-BTUB (*C. tropicale*)

AACATGCGGTGAGATTGTAAGTTGCAGTCCATCACCACAATCACAACAACGCTTGCG  
ACGCGTTTATCCGCCTTGCCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTTTTACCCGACTTCTA  
TGCTCAACAAACCCGCGACGCCTGTCAATCATCGACGTCCAACCTCTGGAATAATTTG

CTGACTGCTGCTTTTTTTTTGTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTC  
TTCCCAAGCCAAATCCAACCGCCTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGGTAAC  
CAGATTGGTGCTGCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACGACCCGGCGATATATA  
CTTGCGAGGACGGCAGATGTTGACGATAGAGTAGGCAAAACATTTCTGGCGAGCAC  
GGCCTCGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGCCCTTATCTGGCCACATTGGTGGTTG  
TCCGCTAAACTCGAACAGCTACAACGGCACATCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGA  
GCGTCTACTTCAATGAAGTTTGTACCTTATAGCCCCAGAGTGCAAGATAAACATA  
TTGACGAGTACTGACCTTCGCTCCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTGCCCCG  
TGCCGTCTCGTTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCTTT  
CGGCCAGCTGTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTGCCGGCAACAA  
CTGGGGCCAAGGGG

>F11244A-BTUB (*C. siamense*)

GTAACATGGGGTGGGATTGGAAGTTGCCAGTCCATCACCACAATCACGACAAGGCT  
TGCGACGCGTTTATCCGCCTTGCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTTTTACCCGACT  
TCTATGCTCAACAAACCCGCGACGCCTGTCAATCATCGACGTCCAAGMTCTGGAAC  
GKTTTGCTGACTGCTGCTTTTTTTTTGTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGCCAGTGC  
GTAAGTCTTCCCAAGCCAAATCCAACCGCCTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACA  
GGGTAACCAGATTGGTGCTGCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACGATCCGGC  
AATATATACTTGCAGAGGACGGCAGATGTTGACGATAGAGTAGGCAAAACATTTCTG  
GCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGCCCTTATCTGGCCACATT  
GGTGGTTGACCGCTAAACTCGAACAGCTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCGA  
GCGCATGAGCGTCTACTTCAACGAAGTTTGTACCTTATAGCCCCAGAGTGCAAGA  
TAAACATATTGACGAGTACTGACCTTCGCTCCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTAC  
GTGCCCCGTGCCGTCTCGTTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCC  
GGTCCTTTCGGCCAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTGCCG  
GCAACAACCTGGGGCCAAGGGTCACTAAA

>F21182A-BTUB (*C. truncatum*)

TAAGTCGTTCTCTCCTCACAAGGAAAAAAAAAAGCACATCTCTGCGACGCGTCGGA  
CCACGTTTATCGGCCTTGCCCTGAACCGTACCCCGCCGATATTCCACCCAACCTTGG  
ACCTCACCGACCAAGACACATCTCGGTCATCGACTGCTTCTACCTTTGTCACCTTTTGC  
TAACATCAATCTTTCTATTCTATAGGTTCACTTGCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTAG  
ATTCCCATCTCAACCCGACGAGCTAGATGCGGGGCTAACTTGTGTAACAGGGTAACC  
AGATTGGTGCTGCCTTCTGGTGCATCCCGAACGCCGAARACTCGGTTATATCAAC  
CTCCAAAGAGTCATGAAGATTAACAATCGAACAGGCAGAACATCTCTGGCGAGCAT  
GGCCTCGACAGCAACGGTGTGTATGTAATCAATTCCTACTCTGGCCACGTCCGGAGTT  
GACCGCTAAATTCATCAAACAGTTACAATGGAACCTCGGAGCTCCAGCTTGAGCGC  
ATGAGCGTCTACTTCAACGAAGTTTGTATCCTACAGTCCCACGCGTTTTAAGACAA  
GCATATTGACGAATACTGACCTTCGCTCCTTCGCAGGCCTCCGGCAACAAGTACGTA  
CCCCGTGCCGTCTCGTTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGCGCCGGT  
CCCTTCGGACAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGC  
AACAACTGTCGTTGGGG

>F52251A-BTUB (*C. alatae*)

CTCTCTGCTTNNNTGCACTGCGAATGTGGGCTATCCGACCGACGGCCTTCCTCCCTTCC  
TGTTCCAGAGAAAAAATTCCCCCGCGACGTCGAGAAGCACTTCGGCTGGGCCAAT  
GTTAACTAAACTGCTACTTTTCTCTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTA  
AGTCTCCCCAAGCCAAATCCAACCGTCTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGG  
TAACCAGATTGGTGCTGCCTTCTGGTACGTGGCGAGACTGCCGACGACCCGGCAATA  
TCATACCTGCGAGAACGACAGATGTTGACGGTGGAGTAGGCCAAAACATTTCTGGCG  
AGCATGGCCTCGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGTCCCTTATCTGGCCACATTGGT  
GGTTGACGGCTAAACTCGAATAGCTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCG  
CATGAGCGTTTACTTCAACGAAGTTTGTACCTTTTAGCCCCCCCAGTGCAAGAAAA  
ACATGTTGACGAGNACTGACCCTCGCTCCCACCNTGCGTCCGGCAACAAGTACGTG  
CCACGTGCCGTCTCGTCNATTTGGANCCCGGTACCATGGACACCGTCCGTGGCGGT  
GCTTCTGNGAGCTCTTGCACCCACAACAACCTTCNTCGTTNTNCNGTTTGGTGTGAG

>F85241C\_BTUB (*C. cliviae*)

GGATTGTAAGTCACTCTGTCCCAATGCAACAATAACATAGCTGCGATGCGTCCACCG  
GTCCTTGCCCTGAGCGTACCCCGCCGGTATTCCACCCGGCGGATTGGACCCGACCG  
AGCACATCACGACACGAGCAACATCGACGTGTCCGCAAGATCGCTGTGCTGACAAT  
CGACTTCTTCTCTCCAGGTTACCTTCAGACCCGGCCAGTGCGTACGTTTCTTCCTAT  
CCCAAGCACATGGAATGAACGCGAGGCTAACTCCTCGACAGGGTAACCAGATTGGT  
GCTGCCTTCTGGTACGTTACGGAACGCCGACAATCCGGCCTCAGCATTGCCTCGACG  
GTCGCAGATCACTGAGAATTAATTAGGCCAAAACATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGA  
CAGCAATGGCGTGTACGTGATAGGTCCCTACTTTGGCAATGTCGGGAGTTGACGGCT  
GATTCCCGGCCAACAGTTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGAATGAGT  
GTTTACTTCAACGAGGTTTGTATCCTGATGTCTCCAACACTTCAAGATGAACCTGTT  
GACGAATACTGACCTCGGTACCTTCTCAGGCCTCCGGCAACAAGTATGTTCCCCGCG  
CTGTCTCGTGCAGCTTGGAGCCCAGTACCATGGACGCGGTTTCGTGCTGGTCCCTTTG  
GCCAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTTGGTCAATCCGGCGCCGGCAACAAC  
GGCCAGGGGTCCACTAAA

>G12B\_BTUB (*C. gloeosporioides*)

TAAGTTGCAGTCCATCACCACAAATCACAACAACGCCTTGCGACGCGTTTATCCGCC  
CTGCCCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTTTACCCGACCTCTTTGCTCAACAAACC  
GCGACGCCTGTCAATCATCGACCTCCTAGTCTGGAATGTTTTGCTGACTGCTGCTTTT  
CTGTCTACAGGTTACCTCCAGACCCGGCCAGTGCGTAAGTCTTCCTAAGCCAAATCC  
AACCGCCTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGGTAACCAGATTGGTGTGCTGCCT  
TCTGGTACGTGACGAGACCCGCCGACGACCCGGCAATATCATACTTGCAGGACGGC  
AGATGTTGACGATGGAATAGGCCAAAACATTTCTGGCGAGCACGGCCTAGACAGCAA  
TGGAGTGTATGTCATGCCCTTATCTGTCCACATTGGTGGTTGACCGCTAAACTCGA  
ACAGCTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACG  
AAGTTTGTACCTTATAGCCCCAAGAGTGCAAGATAAACATATTGACGAGTACTGAC  
CTTCGCTCCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTGCCCCGTGCCGTCTCGTTCGA  
TTTGGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCTTTCCGGTCAGCTCTTCCG  
CCCCGACAACCTTCGTCTTCCGGCCAGTCTGGTGCCGGCAACAACCTGGGACAACCTCGNT  
CTA

>G13A\_BTUB (*C. tropicale*)

TAACATGCGTGAGACTGTAAGTTGCAGTCCATCACCACAATCACAACAACGCTTGCG  
ACGCGTTTATCCGCCTTGCCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTTTTACCCGACTTCTA  
TGCTCAACAAACCCGCGACGCCTGTCAATCATCGACGTCCAACCTCTGGAATAATTG  
CTGACTGCTGCTTTTTTTTTGTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTC  
TTCCCAAGCCAAATCCAACCGCCTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGGTAAC  
CAGATTGGTGCTGCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACGACCCGGCGATATATA  
CTTGCGAGGACGGCAGATGTTGACGATAGAGTAGGCAAACATTTCTGGCGAGCAC  
GGCCTCGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGCCCTTATCTGGCCACATTGGTGGTTG  
TCCGCTAAACTCGAACAGCTACAACGGCACATCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGA  
GCGTCTACTTCAATGAAGTTTGTACCTTATAGCCCCAGAGTGCAAGATAAACATA  
TTGACGAGTACTGACCTTCGCTCCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTGCCCCG  
TGCCGTCTCGTTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCTTT  
CGGCCAGCTGTTCCGCCCCGACAACCTC

>G14B\_BTUB (*C. cliviae*)

GTAAGTCACTCTGTCCCAATGCAACAATAACATAGCTGCGATGCGTCCACCGGTCCT  
TGCCCCTGAGCGTACCCCGCCGGTATTCCACCCGGCGGATTGGACCCGACCGAGCAC  
ATCACGACACGAGCAACATCGACGTGTCCGCAAGATCGCTGTGCTGACAATCGACT  
TCTTCTCTCCAGGTTACCTTCAGACCGGCCAGTGCGTACGTTTCTTCCCTATCCCAA  
GCACATGGAATGAACGCGAGGCTAACTCCTCGACAGGGTAACCAGATTGGTGCTGC  
CTTCTGGTACGTTACGGAACGCCGACAATCCGGCCTCAGCATTGCCTCGACGGTTGC  
AGATCACTGAGAATTAATTAGGCAAACATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCA  
ATGGCGTGTACGTGATAGGTCCTACTTTGGCAATGTCGGGAGTTGACGGCTGATTC  
CCGGCCAACAGTTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGAATGAGTGTTTAC  
TTCAACGAGGTTTGTATCCTGATGTCTCCAACACTTCAAGATGAACCTGTTGACGA  
ATACTGACCTCGGTACCTTCTCAGGCCTCCGGCAACAAGTATGTTCCCCGCGCTGTC  
CTCGTTCGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTTTCGTGCTGGTCCCTTTGGCCAG  
CTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTTGGTCAATCCGGCGCCGGCAACAACCTGGGCA  
GGGGG

>G23B\_BTUB (*C. fruticola*)

ACAACGCTTGCGACGCGTTTATCCGCCTTGCCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTTT  
TACCCGACTTCTATGCACAACAACCCGCGACGCCTGTCAATCATCGACGCCAACT  
CTGGATTGTTTTGCTGACTGCTGCTTTTTTTTTCTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGC  
CAGTGCGTAAGTCTTCCCAAGCCAAATCCAACCGCCTGATTGGGGGGCTAACCTCCT  
TGTACAGGGNAACCAGATTGGTGCTGCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACGA  
CCCGGCAATATCTACTTGCCAGGACGGGAAATGTTGACAATAGAGAAGGCAAACT  
TTTCTGGCAAGCCCGGCTCCACCAGCAATGGAGGGTATGCCTC

>G42B\_BTUB (*C. siamense*)

TTGTAAAGTTGCAGTCCATCACCACAATCACAACAACGCTTGCGACGCGTTTATCCGC  
CTTGCCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTTTTACCCGACTTCTATGCTCAACAAACC  
CGCGACGCCTGTCAATCATCGACGTCCAACCTCTGGAATAATTTGCTGACTGCTGCTT  
TTTTTTGTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTCTTCCCAAGCCAA  
ATCCAACCGCCTGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGTACAGGGTAACCAGATTGGTGCT  
GCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACGACCCGGCGATATATACTTGCGAGGAC

GGCAGATGTTGACGATAGAGTAGGCAAAACATTTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAG  
CAATGGAGTGTATGTCATGCCCTTATCTGGCCACATTGGTGGTTGTCCGCTAAACT  
CGAACAGCTACAACGGCACATCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTC  
AATGAAGTTTGTACCTTATAGCCCCAGAGTGCAAGATAAACATATTGA  
CGAGTACTGACCTTCGCTCCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTGCCCCGTGCC  
GTCCCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCTTTCGGC  
CAGCTGTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTGCCGGCAACAACCTGG  
GCCAGGGGGCGT

>G61B\_BTUB (*C. cliviae*)

CATAGCTGCGATGCGTCCACCGGTCCTTGCCCCTGAGCGTACCCCGCCGGTATTCCA  
CCCGGGCGGATTGGACCCGACCGAGCACATCACGACACGAGCAACATCGACGTGTCC  
GCAAGATCGCTGTGCTGACAATCGACTTCTTCTCTCCAGGTTACCTTCAGACCGGC  
CAGTGCGTACGTTTCTTCCCTATCCCAAGCACATGGAATGAACGCGAGGCTAACTCC  
TCGACAGGGTAACCAGATTGGTGTGCTGCCTTCTGGTACGTTACGGAACGCCGACAATC  
CGGCCTCAGCATTGCCTCGACGGTTGCAGATCACTGAGAATTAATTAGGCCAAAACAT  
CTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGCGTGTACGTGATAGGTCCCTACTTTGG  
CAATGTCGGGAGTTGACGGCTGATTCCCGGCCAACAGTTACAACGGCACCTCTGAG  
CTCCAGCTCGAGCGAATGAGTGTTACTTCAACGAGGTTTGTATCCTGATGTCTCCA  
ACACTTCAAGATGAACCTGTTGACGAATACTGACCTCGGTACCTTCTCAGGCCTCCG  
GCAACAAGTATGTTCCCGCGCTGTCTCGTCGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACG  
CCGTTTCGTGCTGGTCCCTTTGGCCAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTTGGTCA  
ATCCGGCGCCGGCAACAACCTG

>G81\_BTUB (*C. aotearoa*)

TAACATGCGGTGAGATTGTAAGTTGCTGTCCATCACCACAATCACAACAACATTTGC  
GACGCGTTTATCCGGCTTGCCCCTGAGCATACCCGCCGACAGTTTTACCCATGCTC  
ACCAAACCCGCGACGCCCGTCAATCATCGACCTCCTACTCTGGAATGTTTTGCTGAC  
TGCGTCTTTTCTCTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAAGTCTTCCCGA  
GTCAAATCGAACCGCCTGATTGCGGGGCTAACCTCTTTGACGAACAGGGTAACCAG  
ATTGGTGTGCTGCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCGACGACCCGGCATATAACACTT  
GCGAGAAGTACAAATGTTGATGATGGAATAGGCCAAAACATTTCTGGCGAGCACGGC  
CTCGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGTTCCCTTATCTGGCCACATTGGTATTTGACC  
GCTAAATTCGAACAGCTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCG  
TCTACTTCAACGAAGTTTGTACCTTATAGCCCCAGAGTGCAAGATCAACATATTG  
ACGAGTACTGACCTTCGCTCCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTGCCCCGCGC  
CGTCCCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCGG  
CCAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGTCTGGTGCCGGCTACTACTG  
GGCCCAGGGTCACTACA

>G153A\_BTUB (*C. tropicale*)

AGANGAGTTGTCGGGGCGGACAGCTGGCCGAGGGACCAGCACGAACGGCGTCCAT  
GGTACCGGGCTCCAAGTCGACGAGGACGGCGCGGGGAACATACTTGTTGCCGGAGG  
CCTGAGAAGGTACCGAAGGTCAGTATTCGTCAATATGTTTCATCTTGAACGTGGGAG  
ATTCAGGATAACAAACCTATTGAAAGAAAACACTCATGTCGCTCGAGCTGGAGCTC  
NATGGTCNGNTAAAACCTGTTGGCCGGGAATCAACCCCCACTTGCGAAATTGCCAG

GGGCATGACCTATCCTCCCACGCTGTTGCTCCGAGGCCTTGGTCGTGTTTTGCCGAGT  
CTATAATCTTCTTCTGCCCCTCTGCTGNGTGTGAGNCGGCGGCTCCGCCGGAGTCTCG  
CCCCAAGAGAGGGCACAAAGCACCACCAATCCTGTTAGCCTGGCAAGGACCCGCC  
TCGCGTGGGATCCGGGGGGANGCTAGACGTAACCCCAATTTTCGAAGGTCTGA  
CCTCTGATCAAGAAGAAAAACCCGCCAAACTTAACNATATCATAATTGCGGACA  
A

G-3. Secuencias de aislados de *Colletotrichum* spp. con el gen de GAPDH.

>F11244A\_GAPDH (*C. siamense*)

CCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCCACCTACCCCTCCAAACTCG  
CCATGACTTCACATCCATCACCACCACCACCGCTGTCATCTACATCTCGCCACCCGC  
GTTTGGTAAACAAGAAGGCCGTCATGAATGGAGGCCAATTGAAACCATGGGTCTGG  
ACGGCCGGACACATGCTATCACTCATATCAGCCCTACCTGTCACATTTACTGACTCG  
CTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACACCACCA

>F11244B\_GAPDH (*C. ignotum*)

TGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCCACCTAC  
CCATCCAAACTCGCCATGACTTCGCATCCATCACCACCACCACCACCGCTGTCATCT  
ACATCTCGCCACCCGCGTTTGGTAAACAAGAAGGCCGTCATGAATGGAGGCCAATT  
GAAACCATGGGTCTGGGACGGCCGGACACATGCTATCACTCATATCAGCCCCATCTGT  
CGCATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACACCACCA

>F21182A\_GAPDH (*C. truncatum*)

TGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTATGTATCACCCCACCTCTA  
CCCCTCAAACCTCAGCATGATATCATGCCTTCCAAACACGCCAGCCTTCGACTCTC  
GTTGGAAAAACAAAACGAGAGTTCGACGTAAGGCAGAAAGTCAATCATTATAAGCT  
TTTGTTTTAAAGCAATTGATGGCACTGCCCAATTGGCGGAAGTGGCCAGGCAAACCTA  
CGTCAAGCTCAATGGTTTACTGACTCGCCCTCCGCAGGCCTACATGCTCAAGTACGA  
CTCCACCC

>F52251A\_GAPDH (*C. alatae*)

TGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCCACCTAC  
CCCTCCGAACTTGTTCATGGCTTCACATCCATAACCACCACCACCACCACCACCA  
CGGCTGTCATTTATATCTCGCCGCCCTCGTCTGGTAGACGAGAAGGCCATCATAAAT  
TGATGCCAATTGGAACCATGAGCCGGGACGGCCGGATACACGCTATCACTCATATC  
AGCCCCATCTGTCACATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACG  
ACTCCACCA

>F52252D\_GAPDH (*C. gloeosporioides*)

CCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCCACCTACCCCTCCAAGCTC  
GACAAGACTTCACATCCATCGCCACCACTACCGCTGTCATCCGCATTTCCGCCGCCG  
CGGTTAGTACACAAGAAGGCCATCATGAATTAATGCCAATTGAAATCATGGGTCTGG  
GACGGCCGGACACATGCTATCACTCATGTCAGCCCCATCTGTCACATTTACTGACTC  
GCTCTTTACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCC

>F52253A\_GAPDH (*C. alatae*)

TTGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCACCTA  
CCCCTCCGAACCTTGTCATGGCTTCACATCCATAACCACCACCACCACCACCACC  
ACGGCTGTCATTTATATCTCGCCGCCCTCGTCTGGTAGACGAGAAGGCCATCATAAA  
TTGATGCCAATTGGAACCATGAGCCGGGACGGCCGGATACACGCTATCACTCATATC  
AGCCCCATCTGTCACATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACG  
ACACCACCCA

>F85241C\_GAPDH (*C. cliviae*)

GTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTAGCACCCCTCCAAGCTCG  
CCGCGATATCACGCCGCCACCCGTCAATCGCGAACGCCAGCTTCTGGCTGCCGATC  
AGACGCCAAAATCAACCAGGCTCTGATACAGCGAGCGATTGATGGGGCCGGCGCGG  
CGGGGTCGATCACAGCCTCAATGGTTTCGGTTGCTGATACGCCATCCGCAGGCCTAC  
ATGCTCAAGTACGACTCCACCCA

>F133251A\_GAPDH (*C. alatae*)

TTGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCACCTA  
CCCCTCCGAACCTTGTCATGGCTTCACATCCATAACCACCACCACCACCACCACC  
ACGGCTGTCATTTATATCTCGCCGCCCTCGTCTGGTAGACGAGAAGGCCATCATAAA  
TTGATGCCAATTGGAACCATGAGCCGGGACGGCCGGATACACGCTATCACTCATATC  
AGCCCCATCTGTCACATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACG  
ACTCCACCCA

>G12B\_GAPDH (*C. gloeosporioides*)

TGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCACCTAC  
CCCTCCAAGCTCGACAAGACTTCACATCCATCGCCACCACTACCGCTGTCATCCGCA  
TTTCGCCGCCCGCGGTTAGTACACAAGAAGGCCATCATGAATTAATGCCAATTGAAA  
TCATGGGTCCGGACGGCCGGACACATGCTATCACTCATGTCAGCCCCATCTGTCACA  
TTTACTGACTCGCTCTTTACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCA

>G12D\_GAPDH (*C. siamense*)

CCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCACCTACCC  
CTCCAAACTCGCCATGACTTCACATCCATCACCATCACCACCGCTGTCATCTACAAC  
TCGCCGCCCGCGGTTGGTAAACAAGAAGGCCATCATGAATGGAGGCCAATGAAACC  
ATGGGTCCGGACGGCCGGACACATGCTATCAATCATATCAGCCCCATCTGTCACATT  
TACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCA

>G13A\_GAPDH (*C. tropicale*)

TGGGTGGAGTCGTATGTGAGCATGTAGGCCTTGAGCATGTAGGCAGGTGAAGAGCG  
AGTCAGTAAATGTGACAGATGGGGCTGATGTGAGTGATAGCATTGTCCGTCAACGA  
CCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCCGTGAGTATCACCCACCTACCCCTCCAAAATC  
GCCATGACTTCACATCCATCACCACCACCACCGCTGTCATCTACATCTCGCCACCCG  
CGTTTGGTAAATAAGAAGGCCGTCATGAATGGAGGCCAATTGAAACCATGGGTCCG  
GACGGCACGGCCGGACACATGCTATCACTCACATCAGCCCCATCTGTCACATTTACT

GACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCAGACACATGCTATC  
ACTCACATCAGCCCCATCTCTCACATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCT  
CAGGTACGACTCCACCTACCCCAA

>G14B\_GAPDH (*C. cliviae*)

GTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTAGCACCCCTCCAAGCTCG  
CCGCGATATCACGCCCGCCACCCGTCAATCGCGAACGCCAGCTTCTGGCTGCCGATC  
AGACGCCAAAATCAACCAGGCTCTGATACAGCGAGCGATTGATGGGGCCGGCGCGG  
CGGGGTCGATCACAGCCTCAATGGTTTCGGTTGCTGATACGCCATCCGCAGGCCTAC  
ATGCTCAAGTACGAC

>G23B\_GAPDH (*C. fructicola*)

TGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCACCTAC  
CCATCCAAACTCGCCATGACTTCGCATCCATCACCACCACCACCACCGCTGTCATCT  
ACATCTCGCCACCCGCGTTTGGTAAACAAGAAGGCCGTCATGAATGGAGGCCAATT  
GAAACCATGGGTCTGGGACGGCCGGACACATGCTATCACTCATATCAGCCCCATCTGT  
CGCATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCA

>G42B\_GAPDH (*C. siamense*)

TGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCACCTAC  
CCCTCCAAACTCGCCATGACTTCACATCCATCACCACCACCACCACCGCTGTCATCTACA  
TCTCGCCACCCGCGTTTGGTAAACAAGAAGGCCGTCATGAATGGAGGCCAATTGAA  
ACCATGGGTCTGGGACGGCCGGACACATGCTATCACTCATATCAGCCCTACCTGTCAC  
ATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTC

>G61B\_GAPDH (*C. cliviae*)

TTGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTAGCACCCCTCCAA  
GCTCGCCGCGATATCACGCCCGCCACCCGTCAATCGCGAACGCCAGCTTCTGGCTGC  
CGATCAGACGCCAAAATCAACCAGGCTCTGATACAGCGAGCGATTGATGGGGCCGG  
CGCGGCGGGGTCGATCACAGCCTCAATGGTTTCGGTTGCTGATACGCCATCCGCAGG  
CCTACATGCTCAAGTACCCACTCCACCCAA

>G62A\_GAPDH (*C. fructicola*)

TGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCACCTAC  
CCATCCAAACTCGCCATGACTTCGCATCCATCACCACCACCACCACCGCTGTCATCT  
ACATCTCGCCACCCGCGTTTGGTAAACAAGAAGGCCGTCATGAATGGAGGCCAATT  
GAAACCATGGGTCTGGGACGGCCGGACACATGCTATCACTCATATCAGCCCCATCTGT  
CGCATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCAG

>G73D\_GAPDH (*C. tropicale*)

TGGGTGGAGTNGTACTGGGNGGATTGGCACTTAAGCATGTAGGCTNGTGAAGAGCG  
AGTCAGTAAATGTGACAGATGGGGCTGATATGAGTGATAGCAGTGCCGTCAACGGA  
CCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCACCTACCCCTCCAAACTC  
ACCATGACTTCGCATCCATCACCACCACCACCACCGCTGTCATCTACATCTCGCCACCCG  
CTTTTGGTAAATAAGAAGGCCGTCATGAATGGAGGCCAATTGAAACCATGGGTCTGG

GACGGCACGGCCGGACACATGCTATCACTCATATCAGCCCCATCTGTCACATTACTG  
ACT

>G81\_GAPDH (*C. aotearoa*)

TGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCACCTAC  
CCCTCCAAACTCGTCATGACTCTCATCCACAACCAACACCACCGCTGTCATCCACAC  
CTCGCCGCCCGCATCTGGTAGACAAGAAGGCCATCTTGACTTGATGCCAATTGAAAC  
CATGGGCCGGGACGGCGGGACATATGCTATCACTCATAGCAGACCCATCCGTCACA  
TTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGAC

>G121B\_GAPDH (*C. theobromicola*)

GCTCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCCACTTACCCCTCCAAACT  
CGCCACTACTTCACAACCGCCACGGCCGCTGCTGTCGTTACACCTTCCCGCCTGTA  
TTTGGCAGACTACAAGGCCAACGTGAATTGATGCCAATTGATACCATGGCTCGGCAC  
GGCCGGACACAGCTATCACTCATCTCAGCCCCATCTGTCACATGTACTGACTCGCAC  
TTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCAA

>G122A\_GAPDH (*C. karstii*)

GACCCCTTCATTGACACCAACTACGCTGTGAGTATCACCCCACTTACCCCTCCAAGG  
TCATCATGATATCACGCCCCCAACCGTCCCTCGCGGCAGGAGCCTTCCAGCCAATGG  
ACACAGATTCTGGCACACAGCACCTGATGCCAGTGGCC

>G143A\_GAPDH (*C. tropicale*)

CCGTCAAGGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCCGTGAGTATCACCCACCTACCC  
CTCCAAAATCGCCATGACTTCACATCCATCACCACCACCACCGCTGTCATCTACATC  
TCGCCACCCGCGTTTGGTAAATAAGAAGGCCGTCATGAATGGAGGCCAATTGAAAC  
CATGGGTCGGGACGGCACGGCCGGACACATGCTATCACTCACATCAGCCCCATCTGT  
CACATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCGAC  
ACGTGCTATCACTCACATCACCCCATCTCTCACATTTACTGTCTCGCTCTTCACATG  
CCTACATGCTCAAGTACAACCTCCACCCACCCCAAAAGGGACAGTGGGACGTGATGC  
TCGTTTGGCCCAACAAAGCTTCCAAGCA

>G153A\_GAPDH (*C. tropicale*)

TCACCCACCTACCCCTCCNAAATCGCCATGACTTCACATCCATCACCACCACCACC  
GCTGTCATCTACATCTCGCCACCCGCGTTTGGTAAATAAGAAGGCCGTCATGAATGG  
AGGCCAATTGAAACCATGGGTGGGACGGCACGGCCGGACACATGCTATCACTCAC  
ATCAGCCCCATCTGTCACATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGT  
ACGACTCCACCCNACACATGCTATGACTCACATCAGCCCCATCTGTCACATTTACTG  
ACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCAACCCAA

**Apéndice H**  
Números de accesoión de las secuencias de ITS

H-1. Números de accesoión de GenBank de las secuencias de ITS

<b>Aislados</b>	<b>Números de accesoión</b>
F11244A	KR445664
F11244B	KR445665
F21182A	KR445666
F52251A	KR445667
F52252D	KR445668
F52253A	KR445669
F85241C	KR445670
F133251A	KR445671
G12B	KR445672
G12D	KR445673
G13A	KR445674
G14B	KR445675
G23B	KR445676
G42B	KR445677
G61B	KR445678
G62A	KR445679
G73D	KR445680
G81	KR445681
G121B	KR445682
G122A	KR445683
G143A	KR445684
G153A	KR445685