

Evaluación del estado fitopatológico del agraz (*Vaccinium meridionale sw*) en localidades del altiplano cundiboyacense (dos de Boyacá y una de Cundinamarca).

LEIDY CAROLINA CALDERÓN MENDOZA
ANA CAROLINA SOCHA VEGA

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
BIOLOGÍA APLICADA
BOGOTÁ, Marzo de 2009

Evaluación del estado fitopatológico del agraz (*Vaccinium meridionale sw*) en localidades del altiplano cundiboyacense (dos de Boyacá y una de Cundinamarca).

LEIDY CAROLINA CALDERÓN MENDOZA

ANA CAROLINA SOCHA VEGA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar al título de
BIÓLOGAS

Pedro A. Jiménez PhD

Director

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

BIOLOGÍA APLICADA

BOGOTÁ, Marzo de 2009.

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento o su CD sin la autorización oficial de sus autores.

AGRADECIMIENTOS.

En el largo camino de la vida nos vamos encontrando personas maravillosas que nos llenan de muchas cosas buenas entre ellas amistad y conocimiento, es por eso que de una forma muy especial queremos agradecer a las siguientes personas su apoyo y colaboración en el desarrollo de este proyecto:

A Dios y a nuestras familias, ellos son un buen motor para desarrollar con ánimo todos los proyectos que nos propongamos, a nuestro director el Dr. Pedro Jiménez, gracias por su paciencia y colaboración, ya que en todo este tiempo nos supo guiar como maestro y amigo.

Agradecemos también a todas las personas que trabajan en la Universidad Militar Nueva Granada, especialmente a María Sanabria y a Luisa Cabezas, compañeras y amigas.

Agradecemos además a la Dra. Silvia Restrepo, por permitirnos trabajar en las instalaciones de la Universidad de los Andes, y a las siguientes personas que nos colaborarán con el desarrollo de este trabajo:

- Msc. Nadia morales, por su ayuda con las pruebas moleculares.
- Msc: Alejandro Grajales, por su ayuda en los procesos bioinformáticos.
- Dr. María Caridad Cepero de García, por su ayuda en la identificación morfológica de los hongos.
- Dr. Martha Emiliana Cárdenas, por su ayuda en la identificación morfológica de los hongos.

DEDICATORIA

A Dios, que siempre me ha guiado con sabiduría, y me espero al final de un día duro y cansado para rodearme nuevamente de su amor al lado de mi familia.

Mis padres, Martha y William, siempre han tenido mucha fe en mi, desde niña siempre me inculcaron valores, y me han apoyado en mis decisiones, con ustedes aprendí que no hay nada mas valioso e importante que la familia.

Mis hermanos, Andres; Manolo y Cami, son los mejores hermanos que alguien pueda pedir, gracias, han matizado mi vida de colores y me han dado fuerzas para volar y alcanzar mis sueños. A **Sergio**; quien muchas veces se trastrocho con migo y me dio ánimos cuando estuve agotada.

Al Dr. Pedro Jiménez (Pepe), quien supo giarnos como maestro, y amigo, le agradezco que haya enriquecido mi vida profesional y personal con cada uno de sus consejos, puedo decir que aprendí de uno de los mejores, y que gran parte de lo que soy hoy en día como persona y profesional también se lo debo a él, gracias siempre nos has tenido mas fe de la que tal vez nos merecemos.

A **Carolina Socha**, la mejor compañera de trabajo y amiga que alguien pueda pedir, como un ángel ilumino mi sendero, me mostro mis errores y lidio con los altibajos de mi vida, muchas gracias por trabajar conmigo, y gozarnos los PST.

Por ultimo quiero agradecer a mis compañeros y amigos de carrera que se sufrieron el mundo de los hongos, gracias a mí. No tengo mas palabras para decirles que Gracias a todos y que espero tenerlos siempre en mi vida.

CAROLINA CALDERÓN

DEDICATORIA

La culminación de esta etapa de mis sueños, está compendiada en el documento que a continuación presentamos a su consideración, labor desarrollada con esfuerzo, dedicación y disciplina de parte nuestra y el soporte generoso, cálido e invaluable, de quienes en honor a la verdad y la justicia quiero expresar mi sentimiento de eterna gratitud.

A JESUS. Mi guía y mi Señor. Generosa mano que siempre anduvo a mi lado y en los momentos difíciles me tomó entre sus brazos para que mis tropiezos fueran más leves y mis angustias más llevaderas. Eterna compañía que en las horas de tormenta proporcionó paz a mi alma, con dulzura enjugó mi llanto e iluminó plácidamente mi sendero.

A MIS PADRES. Lucrecia y Mario, quienes en cumplimiento de su humilde labor, apoyaron incondicionalmente mis sueños, compartieron una a una mis angustias y se alegraron hasta el llanto con el sabor de mis triunfos.

A MIS HERMANOS. Liliana y Oscar Eduardo, Almas incomparables que me tendieron sus generosas manos, apoyaron mis sueños, escucharon mis quejas con la sabiduría de los viejos y me ayudaron a guiar mi nave hacia puerto seguro.

A MIS PROFESORES. Pedro Jiménez, Director de Tesis, apóstol de la ciencia que nos motivó día a día para continuar con entusiasmo. **Silvia Restrepo,** abnegada investigadora, por permitirnos desarrollar la parte molecular en el LANFU de La Universidad de los Andes. **Nadia Morales,** por su apoyo y dedicación durante los procedimientos de laboratorio.

A todas aquellas personas que como ángeles del cielo, en el transcurrir del tiempo se cruzaron en nuestro camino, algunas veces para aligerarnos la pesada carga, con sus sabios consejos, una sonrisa o un guiño nos mostraron la simplicidad de las cosas que nos atormentaban. A todos y cada uno de ellos, tejedores de sueños. A todos ellos, muchas gracias.

CAROLINA SOCHA.

CONTENIDO

ABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1. REVISION BIBLIOGRÁFICA	
1.1. Clasificación sistemática del agraz.....	7
1.2. Generalidades.....	7
1.2.1. Usos médicos del género <i>Vaccinium</i>	9
1.2.2. Agraz (<i>V. meridionale</i>) en Colombia.....	10
1.3. Patógenos que afectan al género <i>Vaccinium</i>	10
2. METODOLOGÍA	
2.1. Descripción del lugar de estudio.....	16
2.2. Recolección de material vegetal.....	16
2.3. Procesamiento de las muestras.....	17
2.3.1 Esterilización superficial.....	17
2.3.2. Siembra.....	17
2.4. Aislamiento de los hongos.....	17
2.5. Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch).....	18
2.5.1. Obtención de material vegetal.....	18
2.5.2. Cultivos monóspóricos.....	19
2.5.3. Inoculación sobre plantas, ramas, tallos y hojas desprendidas.....	19
2.5.4. Escala de severidad.....	20
2.5. Re aislamiento.....	21

2.6. Identificación morfológica.....	21
2.7. Identificación molecular.....	22
2.7.1. Protocolo de extracción de ADN de hongos.....	23
2.9. Bioinformática.....	25
3. RESULTADOS	
3.1. Sintomatología observada en campo.....	26
3.1.1. Ramas.....	26
3.1.2. Hojas.....	26
3.1.3. Frutos.....	27
3.1.4. Flores.....	28
3.1.5 Tallos.....	28
3.2. Identificación taxonómica de los hongos patógenos.....	28
3.3. Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch).....	32
3.3.1. <i>Alternaría alternata</i>	32
3.3.2. <i>Alternaría tenuissima</i>	33
3.3.3. <i>Alternaría</i> sp.....	35
3.3.4. <i>Pestalotiopsis microspora</i>	36
3.3.5. <i>Pestalotiopsis sydbowiana – microspora</i>	39
3.3.6. <i>Pestalotiopsis vismiae</i>	45
3.3.7. <i>Epicocum nigrum</i>	46
3.3.8. <i>Fusarium oxysporum</i>	48
3.4. Patógenos post emergencia (semillero).....	53
3.5. Incidencia del patógeno sobre las diferentes muestras (plantas, tallos, ramas y hojas desprendidas).....	55
3.5.1. Primera inoculación de organismos patogenos sobre hojas desprendidas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	55

3.5.2. Segunda inoculación de organismos patógenos sobre tallos, hojas y ramas desprendidas de agraz (V. meridionale).....	56
3.6. Inventario de organismos patógenos encontrados en las diferentes localidades.....	58
4. DISCUSIÓN	
5. CONCLUSIONES	
6. RECOMENDACIONES	
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las enfermedades más comunes del género <i>Vaccinium</i>	12
Tabla 2. Escala de severidad, usada en todos los hongos para determinar grado de lesión.....	20
Tabla 3. Condiciones de amplificación de la PCR.....	24
Tabla 4: Cálculos para la reacción de PCR.....	25
Tabla 5. Identificación taxonómica de los hongos patógenos de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	29
Tabla 6. Resumen de las pruebas de patogenicidad realizadas sobre hojas, tallos, ramas desprendidas y plantas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	49
Tabla 7. Escala de severidad de los patógenos sobre el hospedero.....	52
Tabla 8. Inventario de organismos patógenos en diferentes localidades.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flores y frutos de agraz (<i>Vaccinium meridionale</i>).....	8
Figura 2. Esquema que representa de manera resumida la metodología usada en este trabajo.....	15
Figura 3. Montajes de pruebas de patogenicidad en plantas y hojas desprendidas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	20
Figura 4. Muerte descendente en ramas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	26
Figura 5. Necrosis en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	27
Figura 6. racimos de frutos sanos de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	27
Figura 7. Racimo de flores de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	28
Figura 8. Árbol de <i>Pestalotiopsis</i> que muestran la ubicación de las muestras de interés.....	31
Figura 9. Lesiones causadas por <i>A. alternata</i> en la prueba de hojas desprendidas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	32
Figura 10. Lesiones causadas por <i>A. alternata</i> en hojas desprendidas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	33
Figura 11. Lesiones causadas por <i>A. tenuissima</i> en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	34
Figura 12. Lesiones causadas por <i>A. tenuissima</i> en dos troncos diferentes de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	34
Figura 13. Prueba de inoculación de <i>A. tenuissima</i> en ramas desprendidas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	34
Figura 14. Lesiones causadas por <i>Alternaria sp.</i> , en troncos de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	35
Figura 15: Prueba de inoculación de <i>Alternaria sp.</i> en diferentes tejidos agraz (<i>V. meridionale</i>).....	35

Figura 16. Necrosis causada por los diferentes aislamientos de <i>P. microspora</i> en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	36
Figura 17. Lesiones ocasionadas por <i>P. microspora</i> aislamiento D7 en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	37
Figura 18. Lesiones ocasionadas por <i>P. microspora</i> aislamiento E6 en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	38
Figura 19. Necrosis causada por <i>P. microspora</i> aislamiento E6 en tallos de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	38
Figura 20. Necrosis causada por <i>P. microspora</i> aislamiento F12 en ramas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	39
Figura 21. Tipos de necrosis causados por <i>P. sydowniana – microspora</i> en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	40
Figura 22. Lesiones causada por <i>P. sydowniana – microspora</i> aislamiento A9 en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	40
Figura 23. Lesiones causados por <i>P. sydowniana – microspora</i> en hojas desprendidas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	41
Figura 24. Necrosis ocasionadas por <i>P. sydowniana – microspora</i> aislamiento P9 en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	42
Figura 25. Lesiones causadas por <i>P. sydowniana – microspora</i> aislamiento A7 en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	42
Figura 26. Necrosis ocasionada por <i>P. sydowniana – microspora</i> e tallos de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	43
Figura 27. Necrosis ocasionadas por <i>P. sydowniana – microspora</i> aislamiento A4 en troncos de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	43
Figura 28. Necrosis causada por <i>P. sydowniana – microspora</i> aislamiento F2 en ramas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	44
Figura 29. Lesiones ocasionadas por <i>P. sidowiana – microspora</i> aislamiento A4 en plantas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	44

Figura 30. Clorosis causada por <i>P. vismiae</i> aislamiento C1 en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	45
Figura 31. Necrosis producida por <i>P. vismiae</i> aislamiento A11 en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	46
Figura 32. Lesiones ocasionadas por <i>E nigrum</i> en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	46
Figura 33. Lesiones ocasionadas por <i>E nigrum</i> en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	47
Figura 34. Lesiones ocasionadas por <i>E nigrum</i> en plantas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	47
Figura 35. Lesiones causadas por <i>F. oxysporum</i> en hojas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	48
Figura 36. Lesiones causadas por <i>F. oxysporum</i> en tallos de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	48
Figura 37. Lesiones causadas por <i>F. oxysporum</i> en ramas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	49
Figura 38. Lesiones causadas por <i>Curvularia sp.</i> y <i>Ulocladium sp.</i> en plantulas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	53
Figura 39. Lesiones causadas por <i>Curvularia sp.</i> y <i>Ulocladium sp.</i> en plántulas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	54
Figura 40. Lesiones causadas por <i>Curvularia sp.</i> y <i>Ulocladium sp.</i> en plántulas de agraz (<i>V. meridionale</i>).....	54
Figura 41. Incidencia del patogeno en Hojas medido como el porcentaje de muestras afectadas (hojas), por los diferentes patógenos.....	56
Figura 42. Incidencia del patógeno sobre diferentes organos de agraz (<i>V. meridionale</i>) medida como porcentaje de muestras afectadas por el patógeno (hojas, troncos y ramas), por los diferentes patógenos.....	57

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I.

Características generales (Macroscópica y microscópica) de los hongos aislados.

I.I. Descripción general de *Alternaria* sp.

I.I.I. *Alternaria alternata*

I.I.II. *Alternaria tenuissima*

I.I.III. *Alternaria* sp.

I.II. Descripción general de *Pestalotiopsis* sp.

I.II.I. *Pestalotiopsis microspora - sydowiana*. (A4)

I.II.II. *Pestalotiopsis* sp. (A21)

I.II.III. *Pestalotiopsis microspora* (D7)

I.II.IV. *Pestalotiopsis microspora* (F12)

I.II.V. *Pestalotiopsis sydowiana – microspora* (F2)

I.II.VI. *Pestalotiopsis vismiae* (A11)

I.II.VII. *Pestalotiopsis vismiae* (E1)

I.II.VIII. *Pestalotiopsis* sp. (3)

I.II.IX. *Pestalotiopsis vismia – hanseni* (C1)

I.II.X. *Pestalotiopsis sydowiana – microspora* (P9)

I.II.XI. *Pestalotiopsis* sp. (C5)

I.II.XII. *Pestalotiopsis sydowiana – microspora* (A9)

I.III. *Epicocum nigrum*

I.IV. *Fusarium oxysporum*

ANEXO II.

Listado de hongos aislados

II.I. TABLA I. Listado de hongos aislados salida de campo 1

II.II. TABLA II. Listado de hongos aislados salida de campo 2

II.III. TABLA III. Listado de hongos aislados salida de campo 3

ABSTRACT

Vaccinium meridionale is a member of the family Ericaceae occurring mainly in Colombia, Ecuador and Venezuela, above the 2400 m of elevation. Its berries have high antioxidant content, making them a good option for the berries market. Its fruits are very appreciated in the local market and efforts directed to export them have started even though this species remains undomesticated, and the fruits are collected from natural occurring bushes. In Colombia, at least, domestication efforts are just starting and information about the pathogens affecting the crop is necessary. As part of this effort we collected samples in wild populations showing symptoms in order to recover possible pathogenic fungi. Knowledge about these organisms will allow to identify the possible pathological challenges that the *V. meridionale* will face under an organized exploitation.

Species of four different genera was isolate: *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Epicoccum* sp. and *Fusarium* sp.. These genera was have been reported previously as other *Vaccinium* sp. In general the fungi isolate induced detectable symptoms as: necrotic spots, chlorosis spots and red spots, on detached leaves and stems after two o three weeks from inoculation.

INTRODUCCIÓN

La familia de las Ericáceas, entre los que se destacan los arándanos y grupos relacionados a estos, posee una gran diversidad reflejada en los 110 géneros y aproximadamente 4000 especies. De este total 60% tiene algún fin comercial, en particular las especies encontradas en esta familia son utilizadas con fines médicos, decorativos y la gran mayoría de arándanos son utilizados en la industria vinícola y comestible (Avila, 2007; Luteyn, 2002).

Esta familia presenta una amplia distribución geográfica, se localiza en zonas frías y templadas de todos los continentes. Su diversidad se registra en regiones montañosas neotropicales, sobresaliendo muchas especies que son endémicas de América del Sur, estas prefieren bosques montañosos húmedos y fríos ubicados entre los 1500 y los 3000m.s.n.m (Luteyn, 2002).

El género de interés para este estudio es *Vaccinium*, para el cual se ha reportado 48 especies en América del Sur. La especie sobre la cual nos concentraremos es *Vaccinium meridionale*, a la cual nos referiremos de ahora en adelante como agraz, por ser el nombre común más aceptado en los departamentos donde se realizó este proyecto. Cabe mencionar que en los últimos años se han realizado algunos estudios sobre su fisiología, y métodos de propagación, esfuerzo este liderado por instituciones como CORPOICA (Estación La Selva) y CORANTIOQUIA. En departamentos como Antioquia esta planta se presenta como una alternativa para la sustitución de cultivos ilícitos y como una buena alternativa para la producción de empleos (Arjona 2001; Luteyn, 2002).

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años han adquirido importancia económica las frutas exóticas en Colombia. Las condiciones de la región tropical le permiten al país lograr una producción constante durante todo el año (Ávila, 2007). El agraz (*Vaccinium meridionale*), también conocido como mortiño, es uno de los frutales promisorios de alta montaña ya que tiene potencial de exportación hacia Europa y Estados Unidos por ser los principales consumidores de arándanos; además de estar considerado para la sustitución de cultivos ilícitos (CEF, 2004).

En términos de su biología, el agraz (*V. meridionale*) forma asociaciones micorrízicas obligadas (Ericoides), es de hábito arbustivo, crece en alta montaña, sus frutos son ricos en antioxidantes, adicionalmente a nivel comercial puede ser un competidor importante en el mercado de arándanos y a nivel farmacéutico parece tener propiedades benéficas (Canter & Ernst, 2004; Kahlon & Smith, 2005).

En términos agronómicos, tenemos que actualmente el agraz (*V. meridionale*) es explotado en su forma silvestre y aunque se han desarrollado estudios para establecer protocolos de propagación, no se han logrado obtener resultados que permitan la introducción de esta especie en cultivo (Vallejo, 2000; Arjona, 2001 citados por Castrillón, et al 2008). Por otra parte, es difícil planear investigaciones a corto plazo debido a lo lento de su crecimiento, lo cual parece haber dificultado la estandarización de métodos de producción, identificación y manejo de enfermedades, además de otras características agronómicas propias de la especie (CEF, 2004).

El conocimiento sobre los patógenos que afectan a este posible cultivo parece ser inexistente, pues no hemos podido encontrar en la bibliografía referencias al respecto. Esta situación es grave, si consideramos que una condición indispensable para lograr un sistema de domesticación de esta especie, es conocer los posibles patógenos que pueden llegar a afectarla. En consecuencia, este estudio se enfocó a resolver, al menos parcialmente, este vacío de información fitopatológica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar los posibles patógenos presentes en la porción aérea del agraz (*V. meridionale*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

A partir de lesiones en el vástago de agraz, aislar e identificar los posibles patógenos.

Utilizando los organismos aislados, comprobar los postulados de Koch para determinar la relación patógeno lesión.

1. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

La familia de las Ericáceas, comprende árboles, sub-arbustos, y lianas. Adicionalmente, son conocidas por formar asociaciones obligadas con micorrizas y por incluir algunas especies tóxicas y otras venenosas. Las flores en esta familia presentan de 4 a 5 sépalos, que se encuentran soldados en la base. Los estambres generalmente doblan la cantidad de pétalos, las anteras se abren en los poros terminales y las flores comúnmente son hermafroditas, actinomorfas y su corola es hipógina, con ovario generalmente súpero. Las hojas se presentan de manera alterna, simples, sin presencia de estípulas. Las Ericáceas, están presentes en las montañas tropicales como las de Sur África, al nororiente de América, al oriente de Asia, y prácticamente en todas las montañas neotropicales de Suramérica y el Caribe (Judd *et al.*, 1999; Luteyn, 2002; Marroquín, 1994).

Dentro de esta familia, se encuentra el género *Vaccinium*, el cual incluye 450 especies aproximadamente, distribuidas principalmente en las regiones frías del hemisferio norte, algunas especies como *V. floribundum* y *V. meridionale*, responden mejor a los climas de alta montaña. En general las especies de éste género prefieren suelos ácidos, con pH entre 4 y 5, y se ubican entre los 1300 y 3200 m.s.n.m. Sus especies producen frutos que son comestibles; su fruto se desarrolla de un ovario ínfero, por lo que se considera una falsa baya. Estos son usados en un amplio mercado de mermeladas, vinos, rellenos para pasteles, y hasta fruta fresca en los mercados estadounidense y europeo. En nuestro país algunas especies (*V. floribundum* y *V. meridionale*) son comercializadas, y su valor oscila entre \$ 6000 y \$ 7000 pesos / libra, aún cuando se han registrado precios mayores dependiendo de la época del año (Arjona, 2001; Corantioquia, 2002; Judd *et al.*, 1999).

Dentro de este género se encuentran dos subgéneros. El primero de ellos es

Oxycoccus, donde se encuentran los arándanos rojos, que presentan vástagos no leñosos, son delgados y rastreros y los pétalos de sus flores se presentan inclinados (Luteyn, 2002). El otro subgénero es *Vaccinium*, aquí las especies presentan vástagos leñosos, gruesos y erguidos. Las flores presentan forma de campana, variabilidad de colores, olores y formas. Se presta especial atención a especies como *Vaccinium corymbosum*, también conocido como mora azul, pues en investigaciones han encontrado que cuentan con un alto contenido de flavonoides y antioxidantes, además de contener sustancias que podrían ayudar a contrarrestar la enfermedad de Alzheimer (Luteyn, 2002).

1.1. Clasificación sistemática del agraz:

REINO: Plantae.

DIVISION: Magnoliophyta.

CLASE: Magnoliopsida.

ORDEN: Ericales

FAMILIA: Ericaceae.

GENERO: *Vaccinium*.

ESPECIE: *meridionale Sw.*

1.2. Generalidades

Mortiño, es el nombre común con el que es conocido el agraz, este se encuentra distribuido en la mayor parte de la cordillera andina. En Bolivia, Venezuela, Ecuador y Colombia es explotado de plantas silvestres y es comercializado en fresco o en conservas en pueblos y ciudades. En Chile esta fruta es comercializada internacionalmente con el nombre de “mírca bayas” y ha presentado una gran acogida y podría tener un futuro prometedor (National Research Council, 1989).

El agraz, se encuentra en estado silvestre, en las tres cordilleras colombianas, entre los 1800 hasta los 3000 m.s.n.m. Prefiere los suelos ácidos y se desarrolla en bosques secundarios, y en rastrojos bajos, pero ocurre también, frecuentemente, en el sotobosque en plantaciones de pino y ciprés (Arjona, 2001).

Es un arbusto que alcanza hasta 3,5m de altura, muy ramificado, su copa es redondeada. Las hojas son simples, alternas, coriáceo, elípticas, base obtusa y ápice acuminado, además cuenta con un borde aserrado, su nervación es pinnada, presentan una coloración granate, y posteriormente cambian a verde pálido (Arjona, 2001).

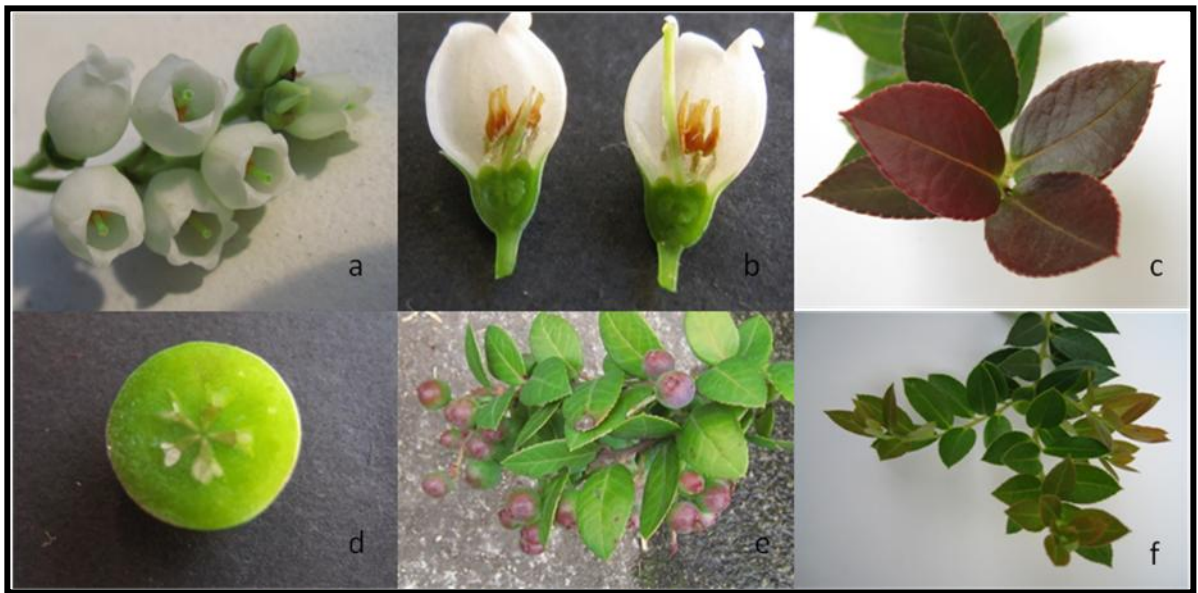


Figura 1. Flores y frutos de agraz (*Vaccinium meridionale*). a) Inflorescencia, b) corte transversal de flor, c) y f) coloraciones que pueden presentar las ramas jóvenes, d) corte longitudinal de fruto, e) racimo de frutos. (Socha, 2009)

Las flores pueden ser tetrámeras o pentámeras, cáliz con lóbulos apiculados, ciliados en el margen hacia el ápice, corola urceolada-cilíndrica, blanca o manchada de rosado o rojo, estigma truncado. La inflorescencia, se presenta

en forma de racimo, presentando de 10 a 15 flores por cada racimo (ver figura 2). En el año se suelen presentar dos floraciones, la primera ocurre entre febrero - marzo y la segunda entre septiembre - diciembre. Su mecanismo de polinización es entomófilo, se reconoce en la literatura a la abeja *Apis mellifera*, como fundamental en este proceso (Arjona, 2001).

El fruto es una baya globosa, de aproximadamente 1cm de diámetro, tiene un color verde cuando se encuentra inmaduro, y cambia a morado oscuro cuando madura (ver figura 2). La fructificación ocurre en dos épocas del año, la primera que es conocida como “mita” se presenta entre abril y mayo, y la segunda tiene lugar entre septiembre y diciembre (Arjona, 2001).

Como asegura Arjona, (2001) “.no se encuentran datos disponibles sobre densidad poblacional, producción por hectárea, ni por planta, al respecto solo puede afirmarse por ahora que la mayor producción se logra de plantas con el 75% de exposición a la radiación solar...” (Montaña Mágica, 2000 citado en Arjona, 2001). Tampoco es posible encontrar información sobre cultivos de esta especie en el país, toda su explotación se realiza de las plantas silvestres constituyendo un modo de explotación extractivo (Corantioquia, 2002).

1.2.1. Usos médicos del género *Vaccinium*.

El género *Vaccinium*, es reconocido porque muchas de sus especies son ricas en antioxidantes tales como flavonoides. En la actualidad, los antioxidantes han adquirido gran importancia en las industrias farmacéutica y médica pues los antocianósidos pueden tener un efecto particular sobre la visión nocturna de las personas. Al parecer, también tienen efectos al prevenir algunos problemas degenerativos de los ojos, en particular la retinopatía diabética (Canter & Ernst, 2004; Kahlon & Smith, 2005). A los flavonoides que contiene el género, también se les atribuyen facultades antivirales, anticancerígenos y antimicrobiales. En algunos estudios, se afirman que *Vaccinium*, produce ciertos compuestos presentes en los frutos,

que ayudan a mantener la flora normal bacteriana, y además evita la colonización por otras especies de bacterias e infecciones del tracto urinario femenino (Kontiokari et al, 2004; Vedenskaya & Vorsa, 2004).

Definitivamente, muchas de las propiedades de *Vaccinium* son de interés médico, y no debe extrañarse que aparte de comercializar sus frutos y flores, también se comercializan por sus “compuestos medicinales” (Kontiokari et al, 2004; Vedenskaya & Vorsa, 2004).

1.2.2. Agraz (*V. meridionale*) en Colombia.

En Colombia una de las especies de *Vaccinium* que más se conoce es *Vaccinium meridionale* Swartz, también conocida como mortiño. La mayoría de estudios realizados en Colombia han sido llevados a cabo en el departamento de Antioquia, donde CORANTIOQUIA en asociación con CORPOICA. Estos estudios se han concentrado en determinar las mejores técnicas de propagación, la fisiología y demás características que permitan, en un corto plazo, implementar cultivos con el fin de brindar alternativas frente a los cultivos ilícitos, y como una manera de contribuir con la generación de nuevos empleos (CEF, 2006).

1.3. Patógenos que afectan al género *Vaccinium*.

Es poca la información que existe con respecto a los patógenos que afectan en Colombia a los géneros silvestres. Sin embargo, en arándanos, Wright, *et al.* (2005) reportan haber encontrado, en un estudio que se realizó en Argentina, los siguientes patógenos *Alternaria tenuíssima*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Pucciniastrum vaccinii*, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Phomopsis vaccinii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia* sp. *Pythium* sp. *Rhizoctonia* sp. *Stemphyllium* sp. *Humicola grisea*, *Sclerotium bataticola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma* sp, *Botrytis cinerea*, y *Agrobacterium*

tumefaciens. Las especies subrayadas, son las que más predominan en los reportes de patógenos del género *Vaccinium* (Wright *et al*, 2005).

En este caso en particular llama la atención la especie *Pestalotiopsis guepinii*, que según el estudio de Wright *et al* (2005), ataca a los tallos y las hojas produciendo en ellas atizonamiento del tejido, manchas foliares y chancros en los tallos. Sin embargo, la Universidad de Michigan, importante centro de investigación en arándanos, no reporta ninguna especie asociada a este género pero si al de *Pestalotia*, específicamente *Pestalotia vaccinii*, el cual es reportado como un hongo post cosecha que afecta el fruto y que produce masas de esporas y micelio blanco. Por otro lado, Fernández *et al* (2004), reportan haber aislado también en Argentina al hongo *Pestalotiosis guepinii*, causando en *Vaccinium corymbosum*, los siguientes síntomas "... manchas foliares color marrón claro, además de manchas con centro oscuro y borde rojo (plateadas bajo lupa) y pardas rojizas..." estos síntomas fueron obtenidos después de verificar los postulados de Koch, además hacen hincapié en que las muestras recolectadas en el campo presentaban los siguientes síntomas "... manchas foliares (plateadas, castaño claro con borde rojo), puntuaciones (rojizas, negras, plateadas), hojas con enrollamiento y amarillamiento, nervaduras con necrosis, atizonamiento de ramas, manchas rojizas y chancros en tallos (Fernández *et al*, 2004; Wharton & Schilder, 2003; Wright *et al*, 2005). A continuación se presentan las enfermedades que ataca comúnmente el género *Vaccinium* (tabla 1).

Tabla 1. Características de las enfermedades más comunes del género *Vaccinium*

PATOGENO	CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD
<i>-Monilinia vaccinii-</i>	Los primeros síntomas aparecen a la 2 – 3 semana antes de la floración, se manifiesta produciendo un secado en

<i>corymbosi:</i>	las hojas de color rojizo a café, también puede afectar el tallo y los frutos jóvenes, la enfermedad se distribuye en parches sobre las hojas. Las lesiones similares a una roya, generan una infección causada por las ascosporas que emergen del envés de la hoja. En la segunda fase se producen las conidiosporas que son dispersados por el viento y por insectos, afectando las hojas y frutos jóvenes (Ramsdell, 2000; Lambert <i>et al</i> , 1987).
- <i>Godronia cassandrae:</i> (<i>Fusicoccum putrefaciens</i>).	En estado asexual este hongo se conoce como <i>Fusicoccum putrefaciens</i> , infecta el tallo, tiene un desarrollo elíptico, de color morado-castaño, las lesiones son de 2.54 a 15.24 cm de longitud, el hongo produce conidiosporas que infectan en temporada de lluvia, produciendo marchitamiento y llegando a afectar el sistema vascular de la planta, produciendo chancros. La enfermedad es residente, aparece en cada temporada de lluvia, que es el mecanismo por el cual se produce la apertura de los picnidios y la dispersión de las conidiosporas (Jay, 2006; Ramsdell, 2000; Ramsdell, 2003).
- <i>Botrytis cinerea</i> .	Los primeros síntomas aparecen como un brote de roya en los racimos de los frutos que aparecen de color gris a negro, afecta también a las hojas viejas causándoles síntomas de necrosis o hasta la muerte, en las hojas jóvenes se presenta como lesiones irregulares entre colores café a rojo, por lo cual se puede confundir con otros hongos; la enfermedad no es residente, es decir no aparece cada primavera, como es el caso de <i>Godronia cassandrae</i> que se produce cada invierno. El hongo se mantiene en estado de micelio hasta que llega la primavera, donde se desarrollan las esporas, y el

	posterior proceso de infección. Esta enfermedad se ve favorecida por temperaturas que están entre 15 –20°C (Lambert et al, 1987; Ramsdell, 2000 y 2003).
- <i>Exobasidium vaccinii</i>	Causante de la enfermedad de las hojas rojas, pues torna las hojas de este color, la mancha roja puede ser generalizada, o distribuida en parches o manchas, la lesión puede estar presente en todas o en algunas hojas, el cambio de estación, se produce una capa blanca de esporas en el envés de la hoja, generalmente no se desarrolla en los frutos, y puede matar las ramas y tallos, la enfermedad puede presentarse en parches desde el pie de la planta hacia arriba. La enfermedad puede resistir de un año al otro en la base de la planta o en el rizoma (Lambert <i>et al</i> , 1987; Ramsdell, 2000 y 2003).
- <i>Colletotrichum gloesporioides</i> :	Este hongo se conoce en arándanos por causar antracnosis, en frutos post cosecha, pero según estudios realizados por Dept. de Patología de plantas, (Michigan State University Extensión Boletín E-2847) la infección del hongo se realiza se produce antes de la cosecha, los síntomas son, royas en las ramas jóvenes, racimos de flores de color café a negro, la esporulación del hongo se produce con el cambio de estación, cuando los frutos maduran, las esporas son de color salmón, que se diseminan a otros frutos maduro (que presentan tejidos mas susceptibles al hongo) o verdes, y a otras partes de la planta por medio de viento y/o lluvia, puede afectar las ramas en primavera si hay suficiente lluvia y humedad en el ambiente (Ramsdell, 2000).
- <i>Alternaria sp.</i>	Produce podredumbre de los frutos que se caracteriza por una serie de agujeros, la fruta pierde contextura y se vuelve acuosa. Los primeros síntomas se producen

cuando hay esporulación del hongo, esta es de color oscuro y ocurre cuando los racimos del fruto son todavía inmaduros, 1 o 2 semanas antes de que se produzca la cosecha y la infección ocurre cuando este se encuentra maduro (Ramsdell, 2000).

- *Microsphaera vaccinii* Este hongo es el causante del mildew polvoso, el cual ataca principalmente a las hojas de las plantas, ocurre a mediados de julio, las hojas son cubiertas por el micelio del hongo que las envuelve en una capa fina y las pliega. Del micelio surgen los cuerpos fructíferos o conidióforos, ellos son los encargados de diseminar la enfermedad, la cual ataca a una gran variedad de plantas (Ramsdell, 2000).
 - *Epicoccum nigrum* Se destaca por producir en el punto de inserción del fruto: crecimiento de un micelio denso de color amarillo a naranja que produce la pudrición del fruto (Wharton & Schilder, 2003).
 - *Pestalotiopsis spp.* Este patógeno produce en las plantas lesiones necróticas de color que varía de rojos a marrones oscuros, tanto en ramas como en hojas y parte apical de las plantas. Se ha observado que este se encuentra por debajo de la corteza y con frecuencia genera daño vascular; y se encuentra asociado con las podas. las plantas afectadas generalmente mueren (Espinoza *et al*, 2008).
-

2. METODOLOGÍA

La metodología usada en este estudio está dividida en varios pasos que comprende la recolección y procesamiento de las muestras, la obtención e identificación de los organismos a evaluar, y el desarrollo de los postulados de Kochs. El siguiente esquema (figura 2) resume la metodología y posteriormente se procede a la explicación de cada uno de los ítems.

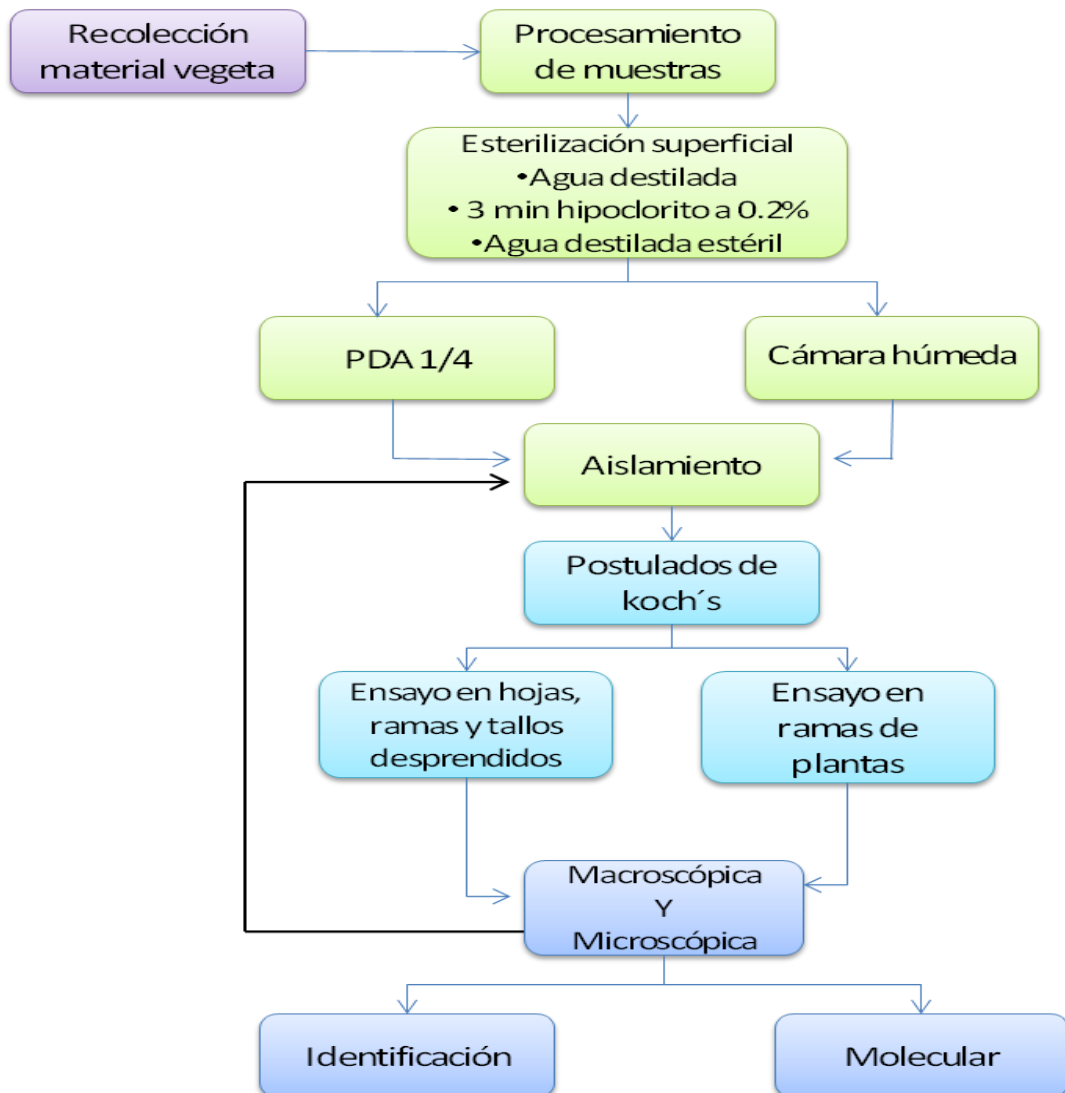


Figura 2. Esquema que representa de manera resumida la metodología usada en este trabajo

2.1. Descripción del lugar de estudio:

El estudio se llevó a cabo en la Estación Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Militar Nueva Granada, Hacienda Río Grande, ubicado en el municipio de Cajicá (Cundinamarca – Colombia) a 4°56,5´N, 74°0,5´W, ubicada a 2580 msnm y una temperatura media anual de 14 °C.

2.2. Recolección de material vegetal

Las muestras fueron recolectadas de plantas silvestres ubicadas en: Tinjacá (Boyacá – Colombia) localizado a 5°34´54`` latitud norte y a 74°38´53`` longitud oeste, con una altura de 2100 msnm y temperatura promedio de 17 °C; en las veredas de Siativa y Peñas.

Nobsa (Boyacá – Colombia) se encuentra ubicada a 5°43´ latitud norte y 73°57´ longitud oeste, con una altura 2510 msnm y temperatura promedio de 15 °C.

Se colectaron de plantas que presentaban lesiones (síntomas de enfermedad) y muestras de la parte aérea que comprendían: tallos, hojas, flores y frutos. Las muestras fueron cortadas de 5 a 10 cm por debajo de la lesión, estas se dispusieron en bolsas de papel y fueron almacenadas en una nevera a 4 °C para su posterior procesamiento.

2.3. Procesamiento de las muestras

2.3.1 El primer paso en el procesamiento de las muestras se realizó esterilización superficial, la cual se desarrolló de la siguiente manera:

Las muestras seccionadas se esterilizaron superficialmente sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 2% durante tres minutos, seguido por dos lavados con agua estéril por tres minutos.

2.3.2. Siembra

Una vez esterilizadas, las muestras fueron divididas en dos. Una porción fue inoculada en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa a un cuarto de la concentración recomendada (PDA1/4). La porción restante fue colocada en cámara húmeda, que consistieron en cajas de Petri con el fondo cubierto por 4 discos de papel absorbente humedecido. Cada arreglo, caja con PDA o cámara húmeda, incluyó ocho muestras por caja con su respectivo duplicado.

2.4. Aislamiento de los hongos

Con el fin de obtener colonias puras, se procedió a realizar un aislamiento de los hongos resultantes de las muestras sembradas en PDA $\frac{1}{4}$ y de cámara húmeda. Para tal fin, los hongos a aislar fueron sembrados de manera individual en agar PDA $\frac{1}{4}$ de concentración. Una vez crecidos, se procedió a realizar cultivos monospóricos, los cuales fueron almacenados y a partir de ellos se realizó el trabajo de identificación usando las guías de identificación de Kíffer et al. 1999 y Barner et al. 1997; además se pusieron a crecer en PDA $\frac{1}{4}$ de concentración los inóculos para las pruebas posteriores.

2.5. Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch)

Los postulados de Koch se realizaron con el fin de hacer un filtro de los hongos que presentaron patogenicidad y solo a aquellos que resultaron patógenos se les hizo taxonomía.

2.5.1. Obtención de material vegetal

El material vegetal para las pruebas de patogenicidad fue adquirido por dos vías:

Se colectaron plantas, se trasladaron a la sede experimental Hacienda Río Grande, donde pasarán un tiempo de aclimatación de dos semanas en las bolsas en las que fueron recolectadas de campo. Posteriormente, se aislaron los posibles patógenos presentes en estas plantas y luego se procedió al trasplante en materas de 5 kg, con sustrato tierra + turba + micorrizas comerciales. Las micorrizas fueron aplicadas a razón de 5g / kg de suelo.

Además, se indujo la germinación de semillas obtenidas a partir de los frutos recogidos en la salida de campo. Se extrajeron las semillas, se dejaron secar por una semana, después fueron sembradas en cámaras húmedas; cuando emergió la radícula y las dos hojas cotiledonares fueron trasplantadas a semilleros de 72 alvéolos, con sustrato turba + tierra + micorrizas comerciales (5g / kg), cuando alcanzaron una altura de 5cm fueron trasplantadas a materas individuales con el mismo sustrato.

Para llevar a cabo las pruebas de patogenicidad al material vegetal que fue usado se le realizó esterilización superficial, con el fin de garantizar que los síntomas que se presentarán correspondieran al organismo inoculado.

2.5.2. Cultivos monospóricos

Para el almacenamiento de los hongos patógenos se realizó un cultivo por agotamiento en agar agua con el objetivo de obtener una espora aislada. Este cultivo fue incubado a 27°C durante 24 horas, después de transcurrido este tiempo con ayuda del estereoscopio se procedió a localizar un conidio aislado que hubiera comenzado su proceso de germinación. Esta espora, fue recuperada e inoculada en el centro de un disco de papel de filtro estéril, previamente colocado en una caja de Petri, sobre la superficie de PDA ¼ . Se incubó a 27°C, por el tiempo necesario para que el micelio creciera y cubriera la totalidad de la superficie del papel de filtro. Luego, este papel se colocó en una caja estéril, sin medio de cultivo, hasta que se deshidrató. Finalmente, se cortó en tiras para ser almacenados en tubos de ensayo con tapa de rosca de 10 mm x 10 cm y volumen 10 cm³, en la nevera a -20 °C.

2.5.3. Inoculación sobre plantas, ramas, tallos y hojas desprendidas

Con el fin de determinar la patogenicidad de los hongos aislados, se realizaron pruebas inoculando, sobre ramas, tallos y hojas desprendidas, en cajas plásticas, donde se ubicaron 6 muestras y se inocularon 500µL de una suspensión 10⁴ conidias/mL por cada muestra, distribuyendo seis gotas de la suspensión sobre el material de inoculación figura 3. En otro ensayo también en cajas plásticas, se colocaron discos de micelio con 3mm de diámetro, obtenidos de zonas de crecimiento activo en cajas de Petri donde crecía el hongo de interés.

Para las pruebas en planta se adicionaron 5mL de una suspensión de esporas a 10⁶ conidias/mL, en estas se adicionó gelatina sin sabor para evitar que las conidias fueran lavadas de la superficie de la planta.








Figura 3. Montajes para las pruebas de patogenicidad. a) Montajes en plantas; b) hojas desprendidas de agraz en caja de plástico; c) gotas del inoculo sobre la hoja de (*V. meridionale*).

2.5.4. Escala de severidad para los síntomas que presenta agraz (*V. meridionale*) a la inoculación de los diferentes patógenos

Se realizaron observaciones para determinar si se produjo o no lesiones sobre su hospedero a partir de esto se diseñó una escala de severidad (Tabla 2).

Tabla 2. Escala de severidad, usada en todos los hongos para determinar grado de lesión, basada en el área afectada del hospedero inoculado.

ESCALA	CARACTERISTICA	FOTOGRAFIA
0	Sin daño o asintomática	
1	1-25% de daño	

2	25-50% de daño	
3	50-75% de daño	
4	75-100% de daño	

2.5.5. Re aislamiento

Después de cinco semanas del seguimiento se procedió a re-aislar el patógeno de las muestras inoculadas, tomando tres muestras que se sembraron en agar PDA ¼ de concentración, se procedió a su identificación para determinar si concordaba con el organismo inoculado y cerrar los postulados de Koch.

2.6. Identificación morfológica

Se realizó la identificación morfológica de aquellos hongos que mostraron ser patógenos con la ayuda de claves (Kiffer et al 1999; Barner et al, 1997) para la identificación taxonómica de hongos.

A nivel macroscópico se determinó:

- _ Color de la colonia y color del reverso.
- _ Producción de pigmento en el medio.
- _ Producción de exudados.
- _ Tamaño de la colonia, diámetro alcanzado en el medio de cultivo, temperatura (27°C y 32°C) y días de cultivo.
- _ Apariencia (correosa, aterciopelada, polvorienta, algodonosa y granular).

A nivel microscópico se determinó:

- _ Micelio : Hialino – Dematiáceo
Septado – Cenocítico.
Ancho (+8µm) – delgado (2 – 7µm).
- _ Producción de estructuras reproductivas (esporas, conidios, conidióforos, estromas, acérvulos, etc)

Montajes

Se emplearon dos tipos de montajes en fresco, que permitieron obtener imágenes de las características microscópicas:

- a) Lámina con agua.
- b) Lámina con cinta.

Para los montajes líquidos se emplearon las siguientes sustancias:

- a) Agua.
- b) Azul de lactofenol.
- c) Lactofenol.

2.7. Identificación molecular

2.7.1. Protocolo de extracción de ADN de hongos

La extracción de ADN se realizó utilizando una modificación del protocolo descrito por Hodge *et al* (1995).

1. Colectar el micelio crecido en 40 ml de SDY líquido (caldo sabouraud's dextrosa suplementado con 1% de extracto de levadura sin agar) por filtración al vacío usando filtros Whatmann.
2. Pasar el filtrado a frascos de liofilización y congelar inmediatamente a -80°C (por al menos 30 minutos).
3. Liofilizar hasta tener el micelio completamente seco (12 a 24 horas).

4. Macerar en seco el liofilizado hasta convertirlo en polvo muy fino.
5. Tomar 100 mg del polvo y colocarlo en un tubo eppendorf nuevo y estéril.
6. Adicionar 1000µL de buffer de lisis (2% CTAB, 3% SDS, 250mM NaCl, 200mM Tris – HCl pH 8.5 y 25mM EDTA) precalentado a 65°C.
7. Homogenizar con vórtex.
8. Añadir 40µL de 2-mercaptoetanol por cada 500µL de buffer de lisis.
9. Homogenizar con vórtex.
10. Incubar las muestras a 65°C por 2 horas. Homogenizar, por inversión suave, cada 10 minutos los tubos.
11. Repartir 500µL del lisado en micro tubos.
12. Adicionar un volumen igual (500µL) de fenol: cloroformo: alcohol isoamil (25:24:1). Invertir y destapar para permitir salida de gases.
13. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min a temperatura ambiente
14. Recuperar el sobrenadante (75% del total) de cada uno de los dos tubos eppendorf y pasarlos a un solo tubo nuevo (solo se tiene un tubo por cepa)
15. Adicionar un volumen igual de cloroformo : alcohol isoamil (24:1)
16. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
17. Recuperar el sobrenadante (75% del total) en un micro tubo nuevo.
18. Adicionar un volumen igual de isopropanol frio (4°C). Mezclar suavemente por inversión y ver aparición de mota blanca.
19. Si aparece, sacar la mota a un micro tubo nuevo con 200µL de etanol al 70% frío para lavar el ADN.
20. Centrifugar 5 min a 13000 rpm, descartar alcohol y dejar secar el pellet.
21. Resuspender como sigue en el punto 24 de este protocolo.
22. Dejar precipitando a – 20 °C toda la noche.
23. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min.
24. Descartar el sobrenadante y observar pellet blanco.

25. Lavar el pellet con 200µL de etanol al 70%, descartar el alcohol y dejar evaporar el alcohol remanente.
26. Resuspender el pellet seco en 50µL de buffer TE 1x (Tris – HCL 0.1 mM y EDTA 10 mM) precalentado a 37°C si el pellet no se re suspende, dejar a 37°C por una hora.
27. Almacenar a – 20°C.

Con el fin de obtener la cantidad suficiente de ADN de las muestras de *Pestalotiopsis sp.* que serian secuenciadas, se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se usaron los cebadores ITS4 y ITS5 y la reacción se leyó posteriormente en un gel de agarosa (1% de concentración), teñido con bromuro de etidio. Luego las muestras fueron enviadas para su secuenciación a MACROGEN Corea y posteriormente se hizo un análisis bioinformático.

Tabla 3: Condiciones de amplificación de la PCR:

PROCESO	TIEMPO	TEMPERATURA
Inicialización	1 – 9 minutos	94 - 96°C
Denaturación	1 – 2 minutos	94 – 95°C
Temperatura de anillaje	20 – 40 segundos	50 – 95°C
Elongación	Dependiendo de la cantidad de ADN	75 – 80°C
Elongación final	5 minutos	75 – 80°C

Nota: proceso realizado en 25 a 35 ciclos. Técnica descrita por Kary Mullis, 1986.

Tabla 4: Cálculos para la reacción:

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final x 1 reacción	Xa 4.2 x
Buffer	10x	1x	2.5uL	10uL
MgCl ₂	25mM	2.5mM	2.5uL	10uL
DNTPs	10mM	0.2mM	0.5uL	2uL
Primer 1	10mM	0.2mM	0.5uL	2uL
Primer 2	10mM	0.2mM	0.5uL	2uL
Taq. Pol	5uni/L	1uni	0.2uL	0.8uL
DNA			1uL	
H ₂ O			17.3uL	69.2uL

2.8. Bioinformática

La edición de las secuencias, y los alineamientos, se completó utilizando el programa CLC DNA Workbench (Lorentzen et al, 2009). Posteriormente, se comparo las secuencias con la base de datos NCBI para su identificación usando un programa BLAST. A continuación con las secuencias obtenidas durante el estudio y algunas reportadas de *Pestalotiopsis* se generaron cladogramas usando el programa “Methodes et Algorithmes pour la bioinformatique” (LIRMIN – CNRS Montpellier) (Dereeper et al, 2008). Para esto se uso el método de máxima verosimilitud.

1. RESULTADOS

3.1. Síntomas observados en campo

A continuación se describen los principales síntomas encontrados en campo, en ramas, tallos, frutos y flores de agraz (*V. meridionale*).

3.1.1. Ramas

La lesión más común fue la muerte descendente, caracterizada por una podredumbre color café a rojizo, granate y se vuelve marrón, esta lesión inicia en el ápice de la rama y desciende a la parte basal alcanzando el tallo, y está generalmente acompañada de la abscisión de las hojas (Figura 4).



Figura 4: Muerte descendente ocurriendo en ramas de agraz (*V. meridionale*), la lesión empieza en el ápice de la rama y desciende hacia el tallo.

3.1.2. Hoja

Las hojas presentaron necrosis de color gris, y café - rojizo ubicado principalmente en el ápice o cerca a la nervadura central; además de parches localizados. Estos eran de color morado, marrón, amarillo o gris. Estas lesiones cubrían parcial o totalmente a la hoja, y se podían observar tanto en el haz como en el envés (Figura 5).



Figura 5: Necrosis en hojas de agraz (*V. meridionale*), la lesión inicia en el ápice de las ramas, afectando las hojas jóvenes y posteriormente las que se encuentran en la parte inferior.

3.1.3. Fruto

Presentaron necrosis tanto en los estados maduros como inmaduros. En algunos casos, se observó la momificación de racimos grandes, alternados con racimos sanos (Figura 6).



Figura 6: Racimos de frutos sanos de agraz (*V. meridionale*).

3.1.4. Flores

Necrosis en racimos florales, que se alternan con flores sanas. Las ramas que soportaban estos racimos no presentaron daños (Figura 7).



Figura 7: Racimo de flores de agraz (*V. meridionale*), se observan flores sanas (blancas), y flores que presentan necrosis (café).

3.1.5. Tallo

Algunas de las lesiones más comunes en tallos de agraz fueron las descarnaciones color gris ubicadas a cualquier altura, la presencia de manchas necróticas de color negro a café, además del cambio de coloración en el centro del tallo de café (normal) a color crema. Se observó también necrosis total de algunos tallos.

3.2. Identificación taxonómica de los hongos patógenos de (*V. meridionale*)

El total de las muestras colectadas fue de 60 aislamientos de hongos filamentosos, ya que los levaduriformes y bacterias fueron descartados al no ser objetivo de interés de este estudio. La identificación taxonómica de los hongos patógenos de agraz consistió en el análisis morfológico de las conidias, conidióforos y colonias de los diferentes aislamientos de interés, de

esta fase se lograron identificar tres especies del género *Alternaria*, una de *Epicoccum* y una de *Fusarium* (tabla 5). Además la posibilidad de tener varias especies del género *Pestalotiopsis* hizo necesario la implementación de pruebas moleculares y bioinformáticas, para dicho género. Al realizar la extracción de ADN y PCR para luego enviar las muestras para su secuenciamiento (Macrogen Corea), y con la ayuda del programa CLC Workbench se logró determinar que las especies concordantes con nuestros aislamientos eran tres: *P. sydowiana*, *P. microspora* y *P. vismiae* (tabla 5).

Tabla 5. Identificación taxonómica de los hongos patógenos de agraz (V. meridionale).

Nomenclatura	Nombre científico
M4-1	<i>Alternaria alternata</i>
M4-2	<i>Alternaria tenuissima</i>
M4-3	<i>Alternaria sp.</i>
A12	<i>Epicoccum nigurm</i>
F4	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Pestalotiopsis sydowiana</i>
A4	- <i>microspora</i>
A6	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>
	<i>Pestalotiopsis sydowiana</i>
A7	- <i>microspora</i>
	<i>Pestalotiopsis sydowiana</i>
A9	- <i>microspora</i>

A11	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>
E1	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>
E6	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
C1	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>
D7	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
	<i>Pestalotiopsis sydowiana</i>
F2	- <i>microspora</i>
F12	<i>Pestalotiopsis microspora</i>

Con los resultados obtenidos del procesamiento bioinformático de los aislamientos de las muestras de *Pestalotiopsis* se construyó un árbol filogenético (figura 8), usando el programa phylogeny.fr (Methodes et Algorithmes pour la bioinformatique) y el método de máxima verosimilitud. El grupo externo utilizado para este análisis fue *Truncatella megaspora*. El árbol permitió evidenciar que las especies de *Pestalotiopsis* se encuentran separadas en dos grupos. Uno de ellos comprende las muestras que fueron identificados como *Pestalotiopsis vismiae* A6, E1, C1 Y A11, en el segundo grupo se encuentran los aislamientos F12, E6 y D7 identificados como *Pestalotiopsis microspora*, y los aislamientos A7, C5, A4 y F2 *P. sydowiana - microspora*, ubicadas en una segunda rama de la parte inferior de la figura, donde también se encuentra la secuencia de comparación de *P. sydowiana*. La especie *Monochaetia monochaeta* queda en una rama disgregada de las especies de *Pestalotiopsis* mientras que *Pestalotia bicolor* quedo incluida dentro del primer grupo del árbol.

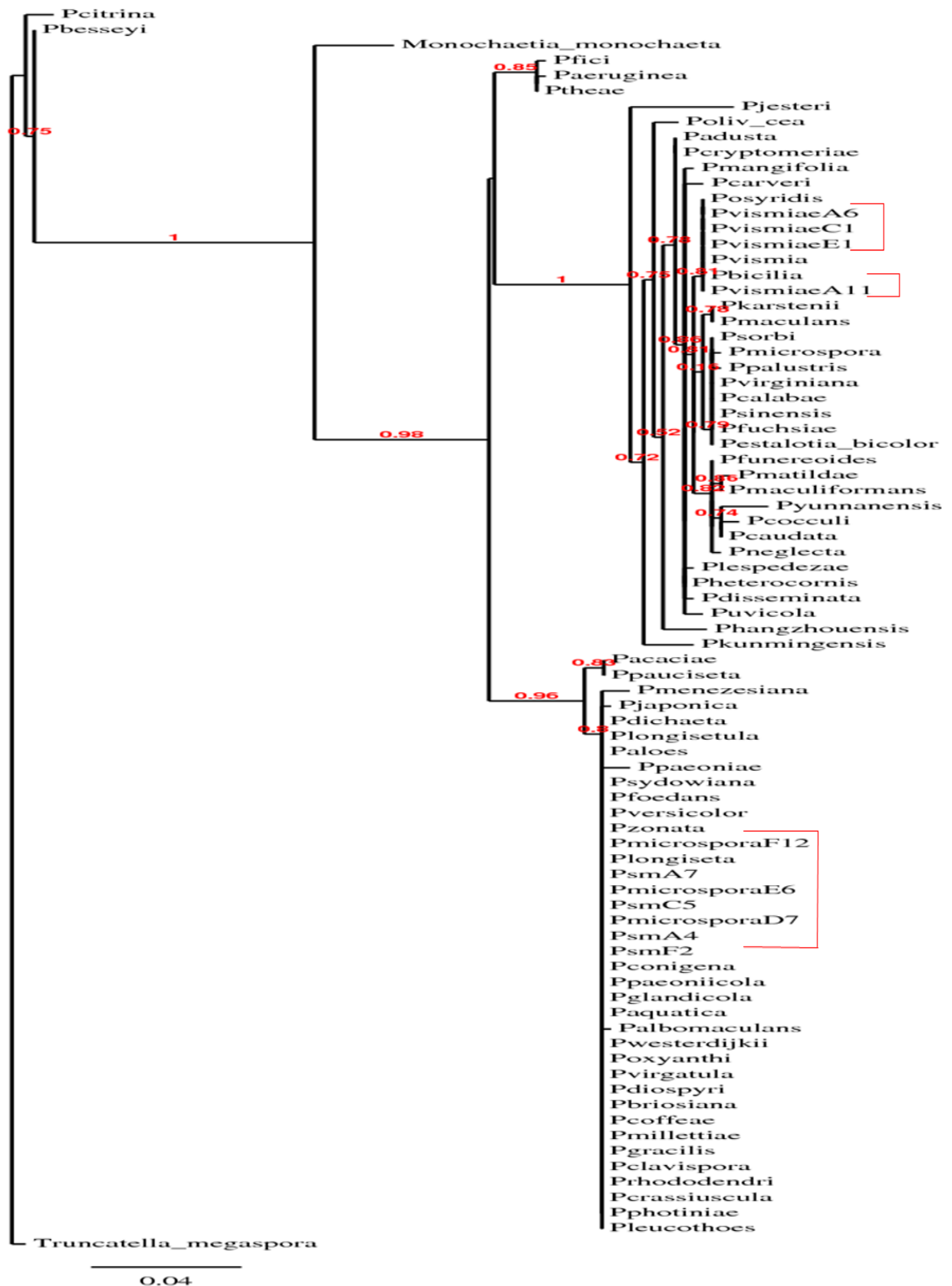


Figura 8. Arbol de *Pestalotiopsis* sp. donde se presenta la ubicación de las muestras de interés. Para ver el árbol en mayor detalle remitase al cd adjunto en este trabajo

3.3. Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch)

Las pruebas de patogenicidad fueron de dos tipos, una fue realizada sobre ramas de plantas en materia y otras sobre ramas, tallos y hojas desprendidas. Las muestras fueron escogidas aleatoriamente de un lote de 16 plantas sembradas en materia, de edades y tamaños diferentes, los resultados que se presentan a continuación comprenden los datos colectados de las dos pruebas (plantas u órganos desprendidos) para cada especie patógena.

3.3.1. *Alternaria alternata*

A partir de este aislamiento se observaron lesiones principalmente en hoja desprendida, las cuales consistieron en dos tipos de lesiones, la aparición de manchas rojas intensas de formas circulares y necrosis. Las primeras aparecieron en la primera semana pos inoculación (1spi) del patógeno, el color rojo era homogéneo, a medida que pasaron las semanas el centro de esta lesión se volvió negro mientras el borde continuaba rojo (Figura 9). La necrosis fue de coloración homogénea, inició en la 1spi con clorosis de la nervadura central y las laterales y posteriormente a esta lesión se observó el desarrollo de la necrosis en la 3spi, el daño inició en el peciolo de la hoja y se diseminó hacia el ápice de la misma (Figura 10).

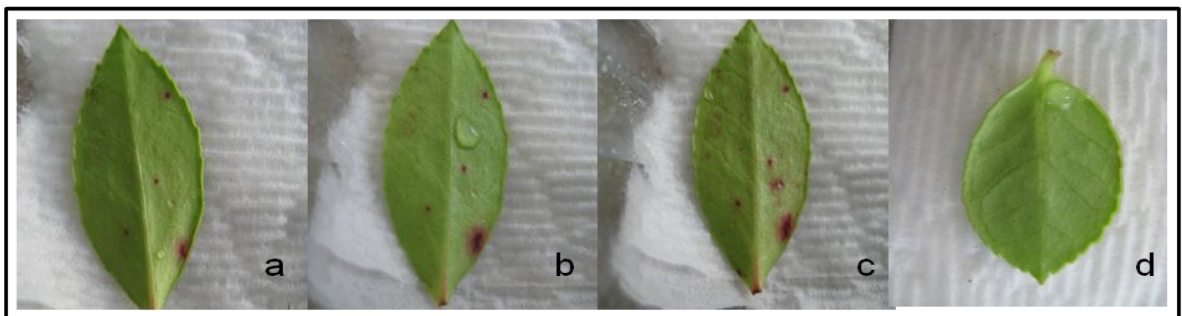


Figura 9. Lesiones causadas por *A. alternata* en la prueba de hojas desprendidas de agraz (*V. meridionale*). a) 1spi, aparición de los síntomas; b) 3spi, cambio de coloración en el centro de la lesión y c) 5spi, la lesión se diseminó sobre el tejido; después de la inoculación; d) control.



Figura 10. Lesiones causadas por *A. alternata* en hojas desprendidas de agraz. a) 1spi, clorosis en las nervaduras; b) 3spi, necrosis desde el peciolo; después de la inoculación; c) control de la prueba.

3.3.2 *Alternaria tenuissima*

Este hongo produjo necrosis en tallo, hojas y ramas desprendidas de agraz. En la prueba de hoja desprendida, la necrosis comenzó en el punto de inoculación del patógeno sobre la muestra, en la 2spi se observó un crecimiento de micelio denso sobre la hoja, además de la necrosis que es de color homogéneo, en la 5spi de muestreo la lesión había invadido totalmente la hoja (Figura 11). En tallos desprendidos, el daño del patógeno se desarrolló de la misma manera que en las hojas, en la 2spi se observó el crecimiento del micelio y posteriormente la necrosis del tejido, 5spi el hongo ya había colonizado totalmente la muestra (Figura 12). En ramas desprendidas no se observó lesión alguna (Figura 13). Para este aislamiento no se realizaron pruebas en plantas.



Figura 11. Lesiones necróticas causadas por *A. tenuissima* en hojas de agraz (*V. meridionale*). a) 2spi, b) 5spi; después de la inoculación; c) control.

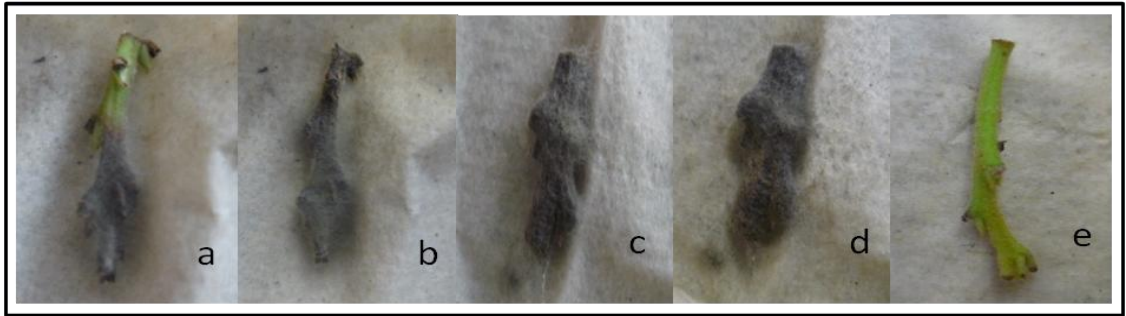


Figura 12. Lesiones necróticas causadas por *A. tenuissima* en dos tallos diferentes de agraz, tronco 1. a) 2spi, b) 5spi; tronco 2, c) 2spi, d) 4spi, después de la inoculación; e) control.



Figura 13. Prueba de inoculación de *A. tenuissima* en ramas desprendidas de agraz. a) 2spi, b) 5spi; después de la inoculación; c) control.

3.3.3. *Alternaria sp.*

Al igual que las otras dos *Alternarias*, *Alternaria sp.*, tiene la capacidad de producir necrosis sobre los tejidos, pero la coloración de la lesión varió. En troncos desprendidos se produjo una necrosis a partir de la 1spi, se distribuyó homogéneamente sobre el tejido y presentó parches de color café claro y oscuro, en la 5spi se observó la colonización del micelio sobre toda la muestra (Figura 14). En ramas desprendidas no se observaron lesiones significativas, y en pocas hojas desprendidas la necrosis empezó en el

peciolo y se distribuyó hacia el ápice de la misma, la coloración de la lesión no fue homogénea pues presentaba tonalidades café oscuro con bordes amarillos (Figura 15).

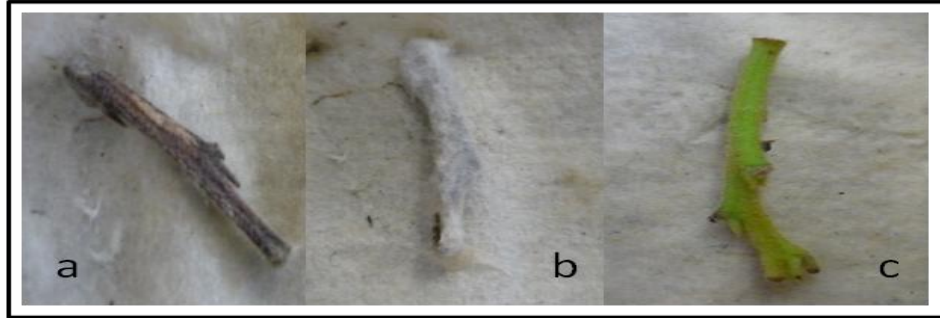


Figura 14. Lesiones causadas por *Alternaria sp.* en troncos de agraz (*V. meridionale*). a) 2spi, b) 5spi; después de la inoculación; c) control.



Figura 15: Prueba de inoculación de *Alternaria sp.* en diferentes tejidos agraz (*V. meridionale*), a) Tronco con necrosis, b) ramas sanas, c) Hoja con necrosis. Imágenes tomadas a la 4spi.

3.3.4 *Pestalotiopsis microspora*

El complejo *Pestalotiopsis* comprende 11 aislamientos que resultaron patógenos distribuidos en tres especies, una de ellas era *Pestalotiopsis microspora* que comprende los aislamientos D7, E6 Y F12.

La lesión más común en la prueba de hojas desprendidas fue la necrosis, la cual dependiendo del aislamiento puede variar de color (figura 16) como se

describen a continuación: las lesiones eran de color café homogéneo en el aislamiento D7, iniciaron a un lado de la hoja y se diseminaron en varios parches necróticos que al final necrosaron totalmente la hoja. Con el aislamiento F12, se produjeron lesiones color café claro en el centro y borde negro, en estas muestras fue común encontrar sobre el tejido estructuras de esporulación como acérvulos. El aislamiento E6 fue el que más presentó variación en el color de las necrosis observadas. Las hojas tomaron colores negros o café claros, la lesión inició generalmente en el peciolo y se distribuyó hacia el ápice de la hoja (figura 16).

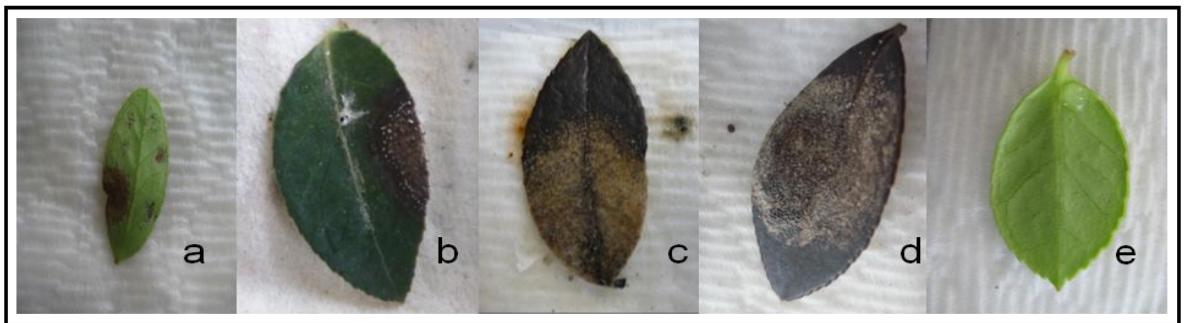


Figura 16. Necrosis causada por los diferentes aislamientos de *P. microspora* en hojas de agraz. a) daño causado por el aislamiento D7, necrosis de color homogénea (3spi); b) daño causado por el aislamiento F12, necrosis con centro de color café claro y borde negro (3spi); c y d) Necrosis causado por el aislamiento E6 (5spi); c) la muestra tomó un color café ocre después de 4spi; d) la muestra se volvió negra y con el tiempo la superficie tomó un color crema; e) control.

De manera particular con el aislamiento D7 se evidenció la presencia de manchas color rojo, las cuales aparecieron en la 3 semana posterior a la inoculación (3spi), se distribuyeron sobre el tejido y con el pasar de las semanas el centro de la lesión se tornó negra mientras los bordes continuaron rojos (figura 17).

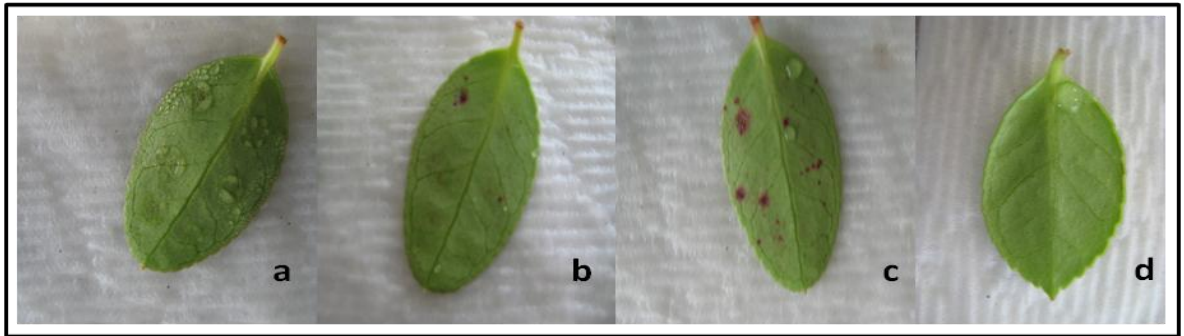


Figura 17. Lesiones ocasionadas por *P. microspora* aislamiento D7 en hojas de agraz. a) 1spi, (hoja sin síntomas); b) 3spi, (aparición de la lesión) y c) 5spi, (invasión de la lesión en el tejido); d) control.

El aislamiento E6, produjo una lesión particular anterior al proceso de la necrosis típica antes reportada, esta lesión consistió en el cambio de color de las nervaduras de verde a morado, y posteriormente se desarrolló la necrosis que inició de color café claro y al final de la invasión de la hoja se tornó negra (figura 18).



Figura 18. Lesiones ocasionadas por *P. microspora* aislamiento E6 en hojas de agraz. a) 2spi, se observa en la parte superior la coloración morada de las nervaduras y la parte inferior la necrosis del tejido; b) 4spi, la necrosis se vuelve de color negro; c) control.

La prueba en tallos y ramas desprendidas solo se le realizó al aislamiento F12, el cual produjo lesión en ambos órganos. En tallo produjo necrosis de

color café claro, se observó la presencia de puntos negros o estructuras de esporulación (esclerocios) creciendo e invadiendo el tejido (figura 19).

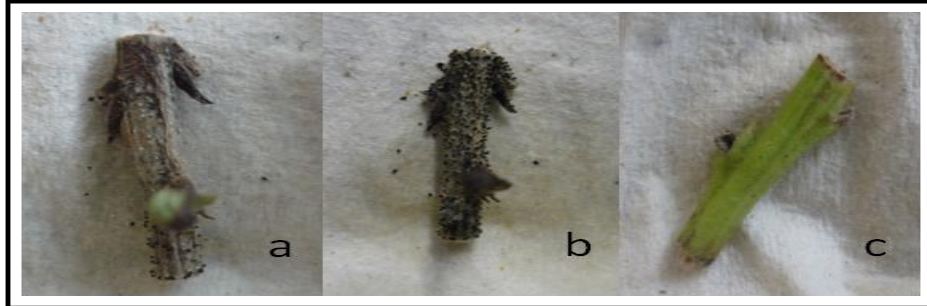


Figura 19. Necrosis causada por *P. microspora* aislamiento E6 en tallos de agraz. a) 2spi, se produjo necrosis del tejido, b) 4spi, crecimiento y diseminación de esclerocios; c) control.

En la prueba de ramas desprendidas se observó necrosis al igual que en los otros órganos, esta fue de color homogéneo, inició en el tallo y ascendió por este hasta llegar al pecíolo de las hojas, se diseminó por la nervadura central tornandola de color negro (figura 20).



Figura 20. Necrosis causada por *P. microspora* aislamiento F12 en ramas de agraz. a) 4spi, la necrosis invadió todo el tallo y comenzó a afectar el nervadura central de las hojas y el tejido adyacente; b) Puntos de esporulación del hongo (esclerocios) creciendo sobre la parte baja de la rama desprendida; c) control.

3.3.5 *Pestalotiopsis sydowiana* - *microspora*

Esta especie comprende los aislamientos A4, P9, A9, F2 y A7, los síntomas presentados por éstos son muy similares a los observados en los aislamientos de *P. microspora*.

En la prueba de hoja desprendida y al igual que *P. microspora* la lesión más representativa fue la necrosis presentada por todos los aislamientos de esta especie. Esta lesión avanzó generalmente desde el pecíolo hacia el ápice de la hoja, sin embargo, la coloración final puede ser diferente dependiendo de la muestra. Así se pueden observar lesiones de colores café oscuro (homogéneo), o café en el centro de la lesión y negro en los bordes (figura 21). En algunas hojas se observó la aparición de acérvulos sobre la superficie del haz de la hoja formando una lesión tipo chancro (figura 21-c y 22-c), o la formación de esclerocios posteriores a la necrosis (figura 21), las hojas que no presentaron este tipo de lesión mostraron daño en el diente teoide con necrosis del meristemo y cambio de coloración en las aserraduras (figura 22-d).

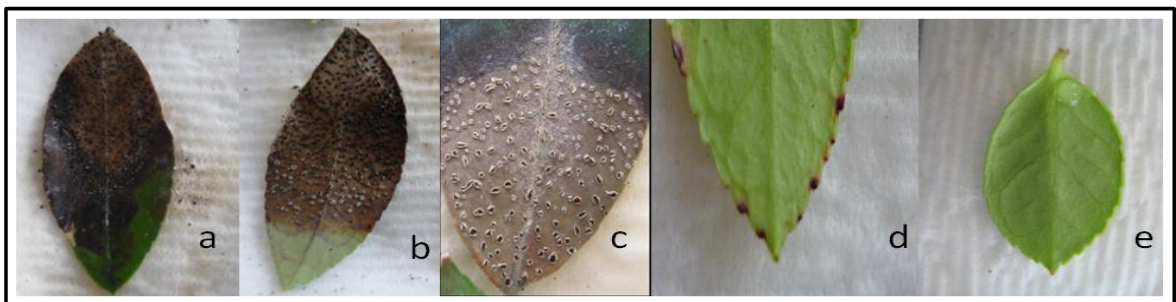


Figura 21. Tipos de necrosis causados por *P. sydowiana* – *microspora* en hojas de agraz. a) Necrosis negra en los bordes y café en el centro causado por el aislado P9, b) Necrosis de coloración homogénea causado por el aislado F2, c) chancro causado por P9, d) necrosis en dientes teoides de la hoja causado por P9. Imágenes tomadas a la 5spi; e) control.

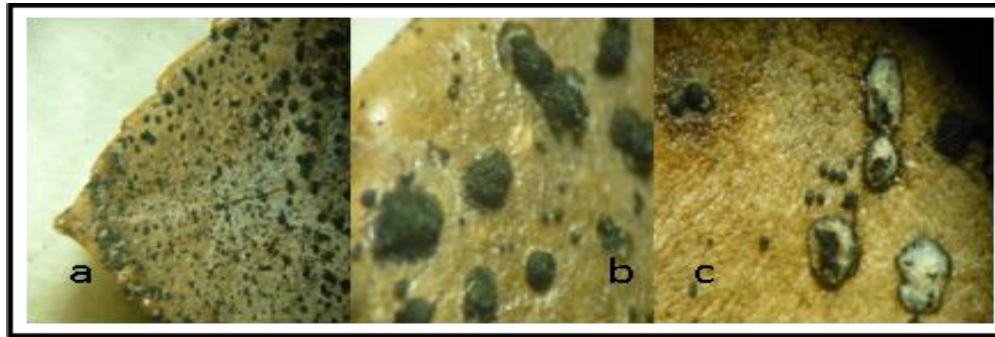


Figura 22. Lesiones causadas por *P. sydowniana* – *microspora* aislamiento A9 en hojas de agraz. a) Hoja afectada por el hongo puntos de esporulación, b) Estructuras de esporulación del hongo (esclerocios); c) acérvulos ocasionados por el hongo.

En algunas hojas del aislamiento A4 se observó una clorosis que va desde la nervadura central de la hoja y se distribuye hacia las nervaduras laterales, al mismo tiempo se evidenció la aparición de puntos cloróticos sobre la hoja (figura 23). En el aislamiento P9 también se presentó la aparición de manchas rojas en las hojas, estas eran circulares y de distribución aleatoria sobre el tejido, con el pasar del tiempo el centro de la lesión se volvió negro y el borde continuaba rojo (figura 23b).



Figura 23. Lesiones causados por *P. sydowniana* – *microspora* en hojas desprendidas de agraz. a) clorosis producida por el aislamiento A4, se observó el cambio de coloración de la nervadura central y las laterales; b)

manchas rojas producidas por el aislamiento P9. Imágenes tomadas a la 5spi; c) control.

Por último para hojas desprendidas se evidenció que las nervaduras y la lámina adquirieron un color que puede ser morado para el caso del aislamiento P9 (figura 24) y rojo para el aislamiento A7 (figura 25). A medida que la lesión avanza, las áreas moradas adquieren un color marrón claro, signo de la necrosis, mientras que las manchas rojas invaden la totalidad de la hoja.



Figura 24. Necrosis ocasionadas por *P. sydobwiana* – *microspora* aislamiento P9 en hojas de agraz. a) 2spi, inicio del cambio de coloración del tejido; b) 4spi, avance de la enfermedad, la mancha necrotica se ve más grande; c) control.

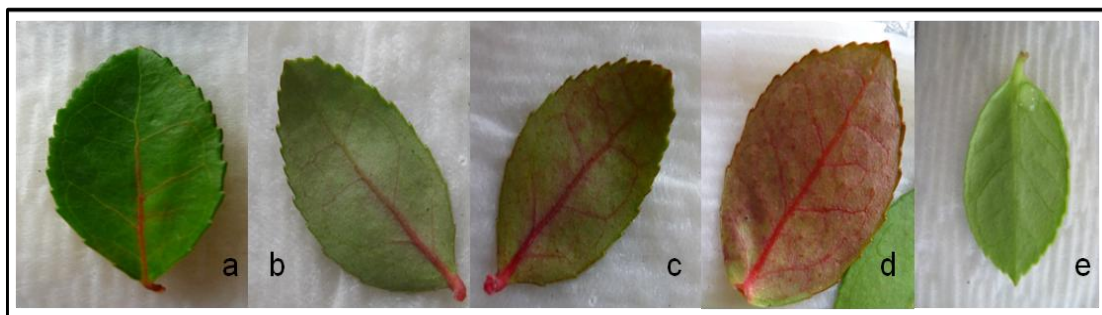


Figura 25. Lesiones causadas por *P. sydobwiana* – *microspora* aislamiento A7 en hojas de agraz. a) Cambio de coloración de la nervadura central, haz de

la hoja, b y c) avance de la enfermedad por el envés 1spi y 3spi, la lesión ascendió por la nervadura central y se diseminó a las laterales, d) en la 5spi la lesión invadió el tejido y alteró el color de las nervaduras; e) control.

A nivel de tallo desprendido la lesión que predominó en todas los aislamientos fue la necrosis, la coloración del daño es homogénea como el causado por el aislamiento A4 y fue común encontrar esclerocios sobre la muestra como en el aislamiento F2 (figura 26). En algunos casos se evidenció que después de la necrosis partes de la corteza del tallo se desprendieron formando parches de color más claro sobre el tejido (figura 27).

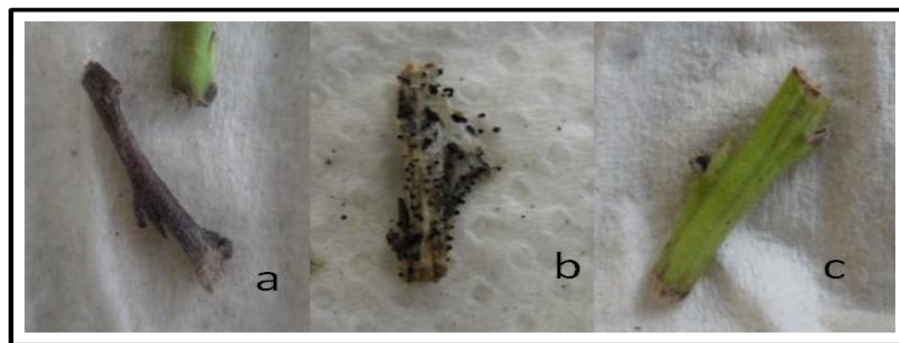


Figura 26. Necrosis ocasionada por *P. sydbwiana* – *microspora* en tallos de agraz. a) Necrosis causado por el aislamiento A4 la coloración de la lesión fue café claro de color homogéneo, b) necrosis causada por el aislado F2, se observo la colonización por parte del micelio y la aparición de abundantes esclerocios sobre el tejido. Imágenes tomadas 5spi.

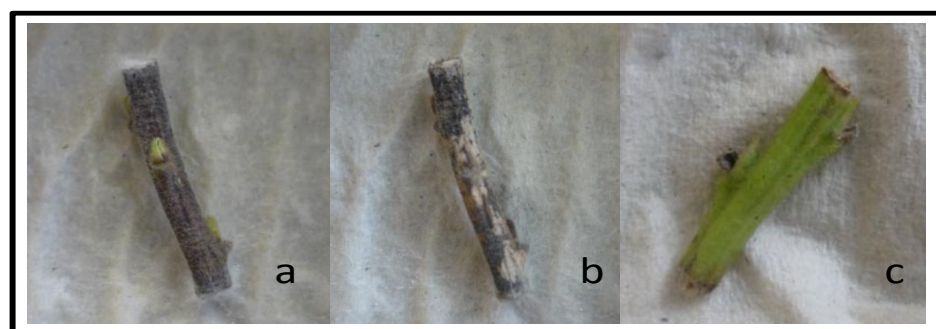


Figura 27. Necrosis ocasionadas por *P. sydowniana* – *microspora* aislamiento A4 en troncos de agraz. a) 2spi, se presenta la necrosis color café; b) 4spi, se observó la pérdida de fragmentos de la corteza.

En ramas desprendidas se observó que el aislamiento F2 fue el único que produjo daño, la lesión inició en las hojas jóvenes de la rama y descendió progresivamente por el tallo afectando otras hojas, la coloración de estas fue homogénea y se observaron esclerocios desarrollándose tanto en tallo como en hojas (figura 28).

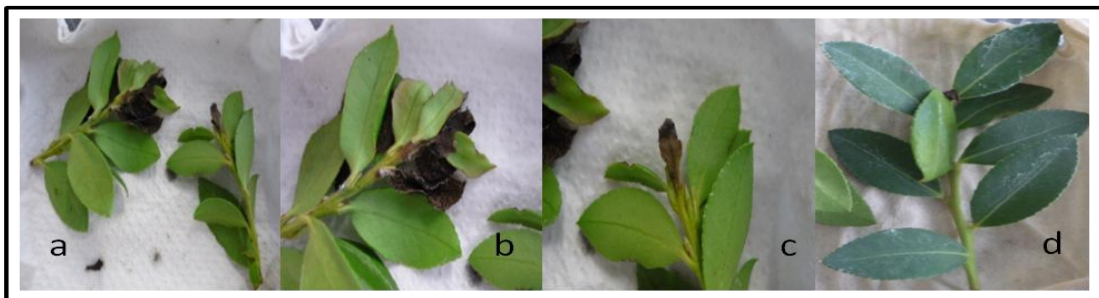


Figura 28. Necrosis causada por *P. sydowniana* – *microspora* aislamiento F2 en ramas de agraz. a) 2spi, b) 4spi; de la inoculación; c) inicio de la necrosis en otra rama del montaje; d) control.

Solo al aislamiento A4 se le realizó prueba en plantas. Se observó el amarillamiento de la nervadura central y las laterales, además de necrosis en algunos meristemos, a los cuales se les hizo un levantamiento y posterior montaje al microscopio donde se observaron las conidias típicas del hongo (figura 29).



Figura 29. Lesiones ocasionadas por *P. sidowiana* – *microspora* aislamiento A4 en plantas de agraz. a) Amarillamiento de las nervaduras laterales, b) necrosis del meristemo c) Planta control.

3.3.6 *Pestalotiopsis vismiae*

Comprende los aislamientos A11 y C1, los cuales se distinguieron por producir daños en hojas desprendidas, los daños son de dos tipos: uno es el amarillamiento de las nervaduras central y laterales producida por el aislamiento C1 (figura 30) y la segunda lesión es la necrosis producida por el aislamiento A11. Esta lesión era de color café claro en el centro y en los bordes se tornan negras, también podían ser de color marrón claro o negras. Iniciaron en el ápice de la hoja, se observaron esclerocios desarrollándose en la superficie de la hoja (figura 31).

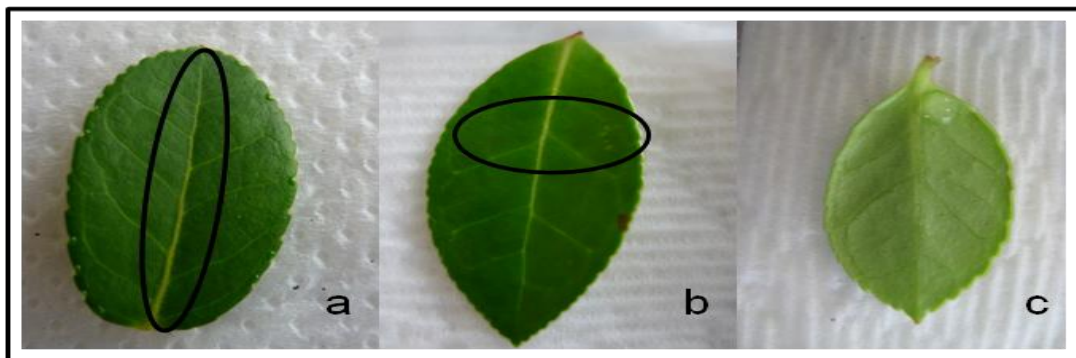


Figura 30. Clorosis causada por *P. vismiae* aislamiento C1 en hojas de agraz. a) amarillamiento de la nervadura central, b) amarillamiento en las nervaduras laterales; e) control.

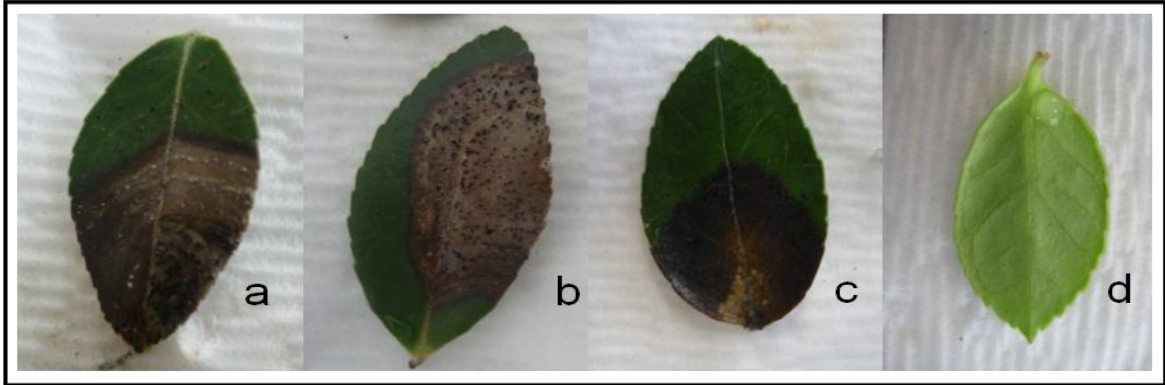


Figura 31. Necrosis producida por *P. vismiae* aislamiento A11 en hojas de agraz. a) Necrosis con centro café y borde negro, nace en el ápice de la hoja y se diseminó hacia el peciolo; b) necrosis café clara con bordes marrón oscuro, se observaron esclerocios sobre el haz de la hoja, c) necrosis color negra que nace en el peciolo y se diseminó hacia el ápice. Imágenes 5spi; e) control.

3.3.7 *Epicoccum nigrum*

Se observó la aparición de clorosis la cual comenzó en la nervadura central, en la parte basal de la hoja y se diseminó a las nervaduras laterales, las cuales en la parte apical mostraron clorosis además de algunos puntos cloróticos (Figura 32 y 33).



Figura 32. Lesiones ocasionadas por *E. nigrum* en hojas de agraz. a) 1spi; b) 3spi; c) control.

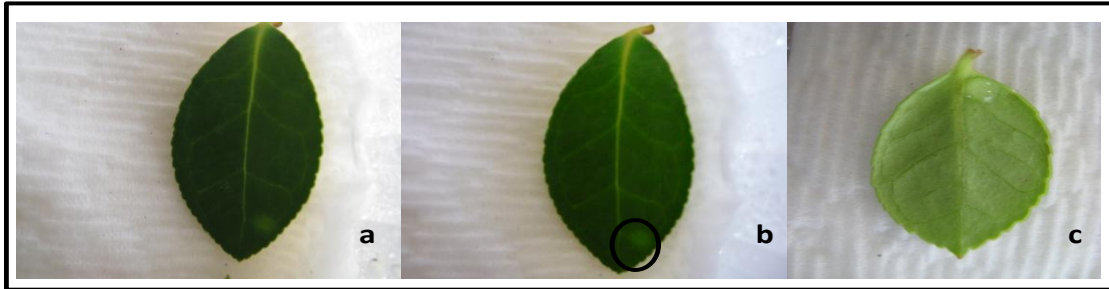


Figura 33. Lesiones ocasionadas por *E. nigrum* en hojas de agraz. a) 1spi, clorosis en la nervadura central y punto dorótico cerca al ápice de la hoja; b) 3spi, diseminación de la clorosis a las nervaduras laterales; c) control.

Las lesiones observadas en plantas consistió en el amarillamiento de la nervadura central que se diseminó hasta el final de la misma o en el ápice, en esta misma región pudo observarse necrosis en algunas hojas (figura 34).

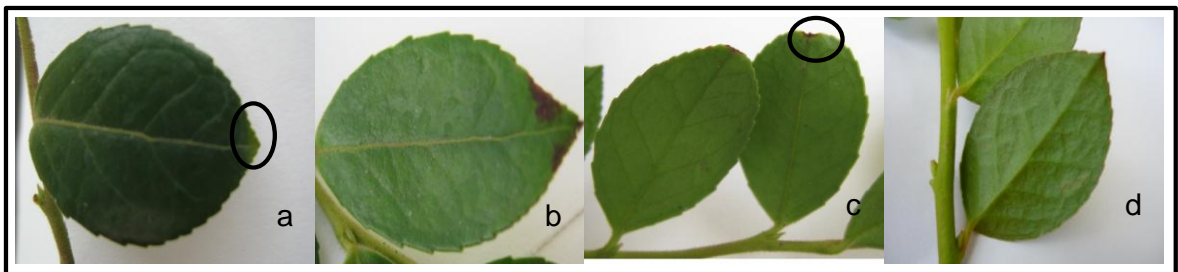


Figura 34. Lesiones ocasionadas por *E. nigrum* en plantas de agraz. a) Clorosis en el ápice; b) Necrosis en el ápice; c) necrosis leve en el ápice, d) control.

3.3.8 *Fusarium oxysporum*

En hojas, se observó el cambio de color de algunas hojas de verde a rojo muy leve. (figura 35).

En tallos, el hongo logró colonizar totalmente el tejido y producir necrosis del mismo, se apreciaron estructuras de reproducción similares a esporodoquios (Figura 36) y en ramas a pesar de que el hongo creció (se vio micelio) sobre el tejido no causó daño visible en estas estructuras (Figura 37).

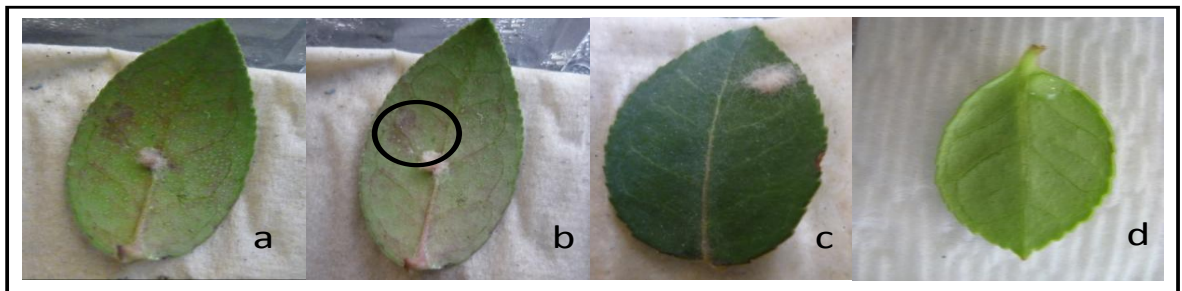


Figura 35. Lesiones causadas por *F. oxysporum* en hojas de agraz. a) 2spi, b) 4spi, en a y b se observa un cambio leve en el color de las hojas, que tienden a volverse moradas c) en esta hoja el hongo creció pero no hubo daño aparente en el tejido; d) control.

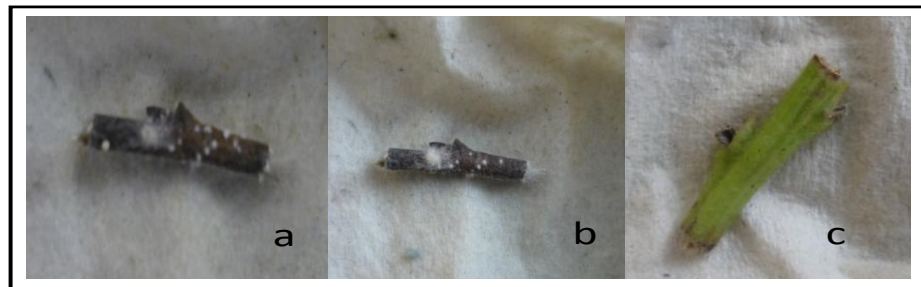


Figura 36. Lesiones causadas por *F. oxysporum* en tallos de agraz. a) 2spi, b) 4spi, en general se observa necrosis en el tejido y el desarrollo de formaciones densas y redondas de micelio que asemejan esporodoquios.

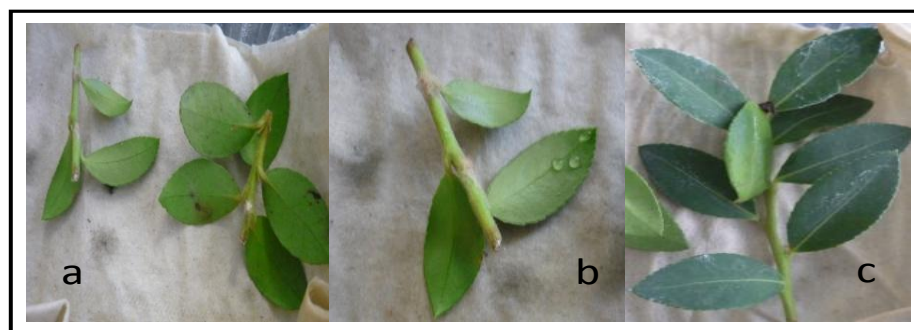


Figura 37. Lesiones causadas por *F. oxysporum* en ramas de agraz. a) Segunda 2spi b) 4spi, el hongo crecio sobre la estructura pero no se evidencio daño en esta; c) control.

En la tabla 6, se presenta de forma resumida los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad realizadas sobre los diferentes órganos de agraz.

Tabla 6. Resumen de las pruebas de patogenicidad realizadas sobre hojas, tallos, ramas desprendidas y plantas de agraz (*V. meridionale*)

Nombre científico	Aislado	Pruebas en hojas desprendidas	Pruebas en tallos desprendidos	Pruebas en ramas desprendidas	Pruebas en plantas
<i>Alternaria alternata</i>	M4 - 1	Manchas foliares rojas, necrosis y clorosis en nervaduras	ND	ND	Clorosis en nervaduras
<i>A. tenuissima</i>	M4 - 2	Necrosis	Necrosis	ND	ND
<i>Alternaria</i>	M4 - 3	Necrosis	Necrosis con	ND	ND

sp.		parches			
<i>Pestalotiopsis is microspora</i>	D7	Necrosis, manchas rojas, nervaduras rojas	ND	ND	ND
<i>Pestalotiopsis is microspora</i>	F12	Necrosis	Necrosis	Necrosis	ND
<i>Pestalotiopsis is microspora</i>	E6	Necrosis de diferentes colores, nervaduras moradas	ND	ND	ND
<i>Pestalotiopsis is sydowiana – microspora</i>	A4	Clorosis en nervaduras	Necrosis descamación de la corteza	ND	Clorosis en nervaduras puntos cloróticos, necrosis de meristemo
<i>Pestalotiopsis is sydowiana - microspora</i>	P9	Necrosis, tejido y nervaduras moradas, daño en diente teoide, manchas rojas	ND	ND	ND
<i>Pestalotiopsis is sydowiana –</i>	F2	Nervaduras moradas,	Necrosis	Necrosis	ND

<i>microspora</i>		necrosis			
<i>Pestalotiopsis is sydowiana - microspora</i>	A9	Necrosis	Necrosis	ND	ND
<i>Pestalotiopsis is sydowiana - microspora</i>	A7	Necrosis leve, nervaduras rojas, tejido rojo	Necrosis	ND	ND
<i>Pestalotiopsis is vismiae</i>	A11	Manchas foliares rojas, necrosis	ND	ND	ND
<i>Pestalotiopsis is vismiae - hanseni</i>	C1	Clorosis en nervaduras, puntos cloróticos	ND	ND	ND
<i>Epicoccum nigrum</i>	A12	Clorosis en nervaduras, puntos cloróticos, necrosis apical leve	ND	ND	Clorosis en nervaduras , y puntos necróticos en el ápice de hojas
<i>Fusarium oxysporum</i>	F4	ND	Necrosis	ND	ND

Nota: ND: no determinada, en algunos casos la prueba no se hizo o resultó contaminada.

ESCALA DE SEVERIDAD

La escala de severidad fue realizada tomando como referencia la máxima área afectada por el patógeno, y se tomo por consenso el mayor número de

la escala que fue observado. Los patógenos que menos área afectaron fueron *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Epicoccum nigrum* que presentaron una escala de 1, mientras que los aislados de *Pestalotiopsis sp.*, presentaron el mayor grado en la escala para área afectada.

Tabla 7. Escala de severidad de los patógenos sobre el hospedero:

PATOGENO	ESCALA DE SEVERIDAD
<i>Alternaria alternata</i>	1
<i>Alternaria tenuissima</i>	4
<i>Alternaria sp.</i>	4
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	3 – 4
<i>Pestalotiopsis sydowiana – microspora</i>	1 – 4
<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	3
<i>Fusarium oxysporum</i>	1
<i>Epicoccum nigrum</i>	1

3.4 Patógenos post emergencia (semillero)

En la obtención de material vegetal para las pruebas de postulados de kock`s se realizaron cámaras de germinación (caja de petri con papel absorbente) este proceso se llevo a cabo en la localidad de Cajicá – Cundinamarca en el mes de octubre del año 2006, durante el cual se identificaron dos hongos (*Curvularia sp.* y *Ulocladium sp.*) causando daño en plántulas de agraz.

Se observaron varios tipos de lesiones, tales como la ausencia de raíz (no desarrollo del sistema radicular), formación de nodos en los meristemas de apicales de la raíz, además de deformación del sistema radicular (Figura 38).

En los casos antes mencionados las partes aéreas de la planta (tallo y hojas cotiledonales) se desarrollaron normalmente, aunque el tallo podía presentar coloraciones rojas anormales, al igual que el borde de las hojas. Otro tipo de lesión fue el enanismo en las plántulas, y la formación de agallas entre la raíz y el tallo (Figura 39). Se pudo observar con la ayuda del microscopio la colonización por parte de las hifas de los hongos en los tejidos de las raíces (Figura 40)

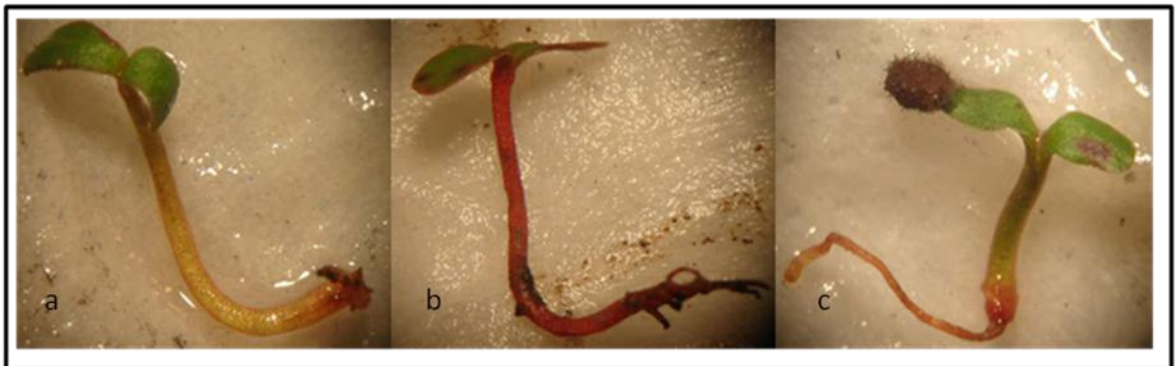


Figura 38. Lesiones causadas por *Curvularia sp.* y *Ulocladium sp.* en plantulas de agraz (*V. meridionale*). a) Plántula sin sistema radicular. b) Nodos en ápice de la raíz, c) Deformación de raíz, necrosis en hoja.



Figura 39. Lesiones causadas por *Curvularia sp.* y *Ulocladium sp.* en plántulas de agraz (*V. meridionale*). a) Plántula enana. b) Aparición de agalla prominente en la parte baja del tallo, c) Plántula enana.

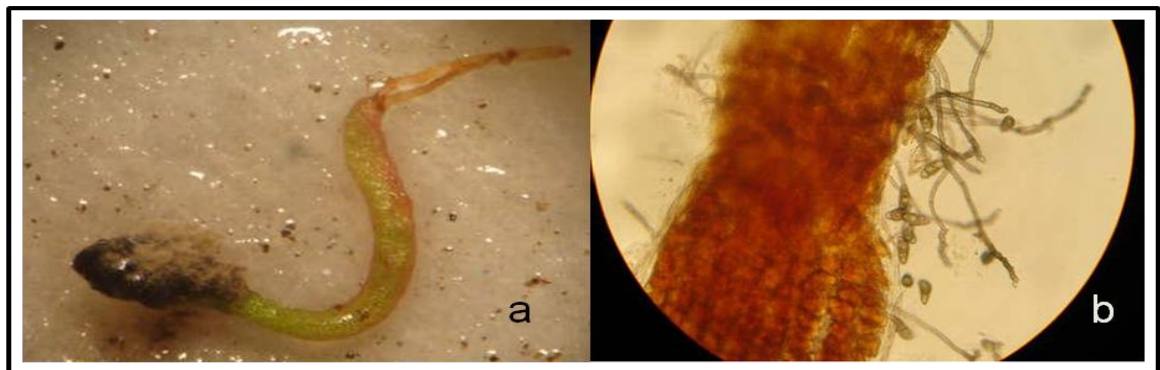


Figura 40. Lesiones causadas por *Curvularia sp.* y *Ulocladium sp.* en plántulas de agraz. a) Invasión de hongo en semilla, b) raíz de plántula (conidias de *Curvularia sp.* y *Ulocladium sp.*).

3.5 Incidencia de los patógenos sobre las diferentes muestras (plantas, tallos, ramas y hojas desprendidas)

Las pruebas de patogenicidad en plantas, tallos, hojas y ramas desprendidas se realizaron en dos épocas. En la primera se realizaron pruebas sobre hojas desprendidas y plantas, esta inoculación de los patógenos se realizó entre

los meses de abril y junio del 2008, en los cuales se reportó una temperatura promedio del aire de 12°C y una humedad relativa promedio de 85,40%.

La segunda inoculación se realizó sobre hojas, tallos y ramas desprendidas entre los meses de enero y marzo del 2009, en los cuales se registro un promedio de T° de 12°C y una humedad relativa promedio de 83.17% (datos obtenidos de estación meteorológica de la Hacienda Río Grande, Cajica, Cundinamarca, donde se llevaron a cabo los ensayos).

En este trabajo, el concepto de incidencia se tomó como el número de individuos de una población que es afectada por una enfermedad o infección en un periodo de tiempo determinado. Entoces, se determinó el porcentaje de muestras (hojas desprendidas para la primera inoculación) y tallos, ramas y hojas desprendidas para la segunda inoculación (figuras 41 y 42).

3.5.1 Primera inoculación de organismos patógenos sobre hojas desprendidas de agraz.

Al analizar los datos, se determinó el porcentaje de las muestras inoculadas que desarrollaron algún tipo lesión (sin discriminar cual fuera). Según la figura 43 el patógeno que presentó el mayor porcentaje de hojas desprendidas afectadas fue el aislamiento A7 de *Pestalotiopsis sydobwiana* – *microspora*.

Entre las especies que no produjeron daño en ninguna de las muestras se encuentran un aislado de *Alternaria* sp, dos aislados de *Pestalotiopsis* y uno

de *F. oxysporum* (Figura 41). Las barras de error permiten evidenciar una diferencia leve al daño producido por el patógeno sobre el hospedero.

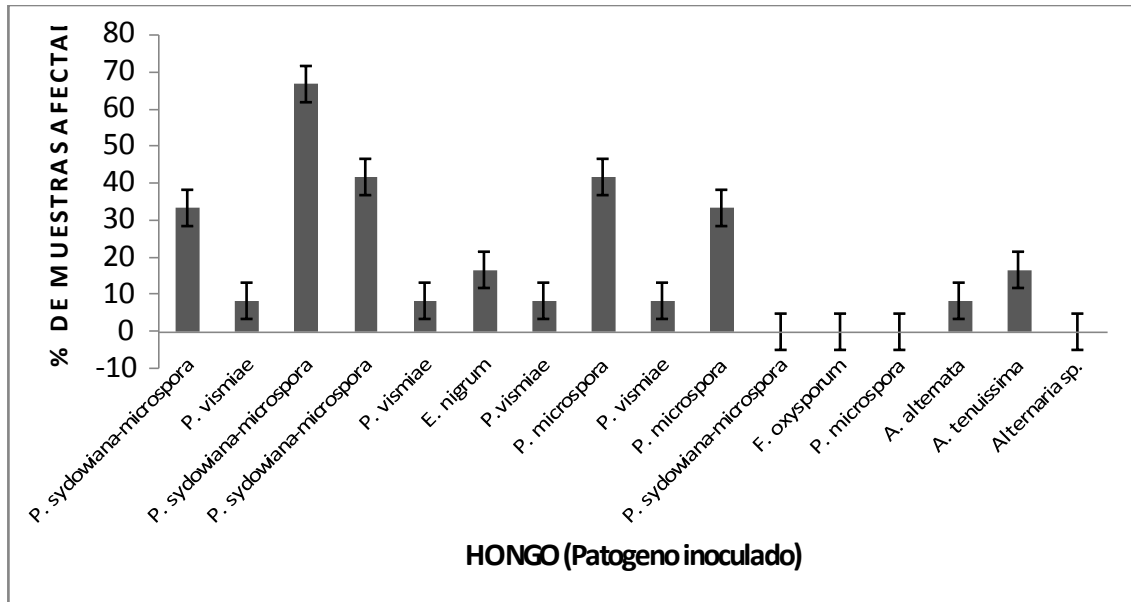


Figura 41. Incidencia del patogeno en Hojas, porcentaje de muestras afectadas (hojas), por los diferentes patógenos.

3.5.2 Segunda inoculación de organismos patógenos sobre tallos, hojas y ramas desprendidas de agraz.

Para la segunda inoculación se tomaron hongos aleatoriamente (entre los que habian sido patógenos en la primera inoculación y los que no presentaron daños) y se repitieron las pruebas inoculando tallos, hojas y ramas desprendidas. Se determinó que porcentaje de las muestras desarrollaron enfermedad o presentaron lesiones (figura 42). Según la figura 44 los hongos que presentaron mayor número de hojas afectadas fueron *A. alternata* y *P. sydowiana-microspora* (aislamiento F2) y *P. microspora* (aislamiento E6). Los patógenos que presentaron mayor porcentaje de muestras afectadas en ramas y tallos fueron los aislamientos A7 y F2 de *P.*

sydowiana-microspora y *A. tenuissima* (figura 42). Para mayor detalle de los hongos ver Tabla I de Anexos II.

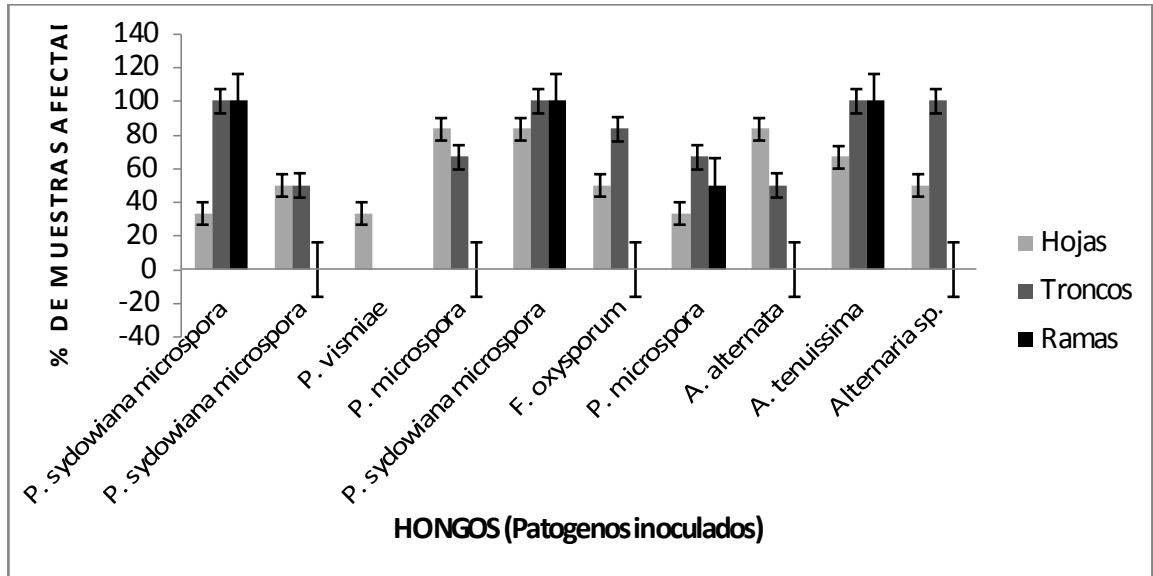


Figura 42. Incidencia del patógeno sobre diferentes órganos de agraz medida como porcentaje de muestras afectadas por el patógeno (hojas, troncos y ramas), por los diferentes patógenos.

3.6 Inventario de organismos patógenos encontrados en las diferentes localidades

A partir de los resultados obtenidos (identificación taxonómica de los hongos patógenos), se realizó una tabla inventario con el fin de determinar las especies que fueron encontradas en cada área de muestreo. De las tres localidades muestreadas, la localidad de Cajicá fue la que presentó mayor número de especies seis en total, en contraste con la localidad de Nobsa

donde se aislaron el menor número de patógenos. La mayor cantidad de aislamientos se obtuvieron en la localidad de Tinjacá (Tabla 8).

Tabla 8. Inventario de organismos patógenos en diferentes localidades

SALIDA DE CAMPO 1 (TINJACA)		
Aislado	Organo del cual se colecto el patógeno	Hongo aislado
		<i>Pestalotiopsis.</i>
A4	Troncos	<i>sydowiana - microspora</i>
A6	Troncos	<i>P. vismiae</i>
A7	Troncos	<i>P. sydowiana - microspora</i>
A9	Troncos	<i>P. sydowiana - microspora</i>
A11	Hojas	<i>P. vismiae</i>
A12	Hojas	<i>Epicocum nigrum</i>
E1	Troncos	<i>P. vismiae</i>
E6	Hojas	<i>P. microspora</i>
SALIDA DE CAMPO 2 (NOBSA)		
C1	Troncos	<i>P. vismiae</i>
D7	Hojas	<i>P. microspora</i>

SALIDA DE CAMPO 3 (CAJICA)

F2	Hojas	<i>P. sydowniana - microspora</i>
F4	Hojas	<i>Fusarium oxysporum</i>
F12	Hojas	<i>P. microspora</i>
M4-1	Hojas	<i>Alternaria alternata</i>
M4-2	Hojas	<i>A. tenuissima</i>
M4-3	Hojas	<i>Alternaria sp</i>

4. DISCUSIÓN.

La importancia que actualmente presenta el agraz y su gran potencial en los mercados de Estados Unidos y Europa como los principales consumidores de arándanos a nivel mundial según lo reporta el CEF; 2004.; hace que el interés por los problemas fitosanitarios que pueda tener este producto incrementen los esfuerzos en la búsqueda de los patógenos importantes para esta planta.

En estudios realizados en Argentina por Wrigth *et al*, 2005; en Chile por Espinoza y Briceño, 2008 y en Uruguay por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2008, reconocen a géneros como *Pestalotiopsis sp.*, *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, entre otros; como patógenos en plantas del género *Vaccinium sp.*, causantes de lesiones importantes como necrosis, manchas foliares o chancros.

En este estudio se encontraron 4 géneros, causantes de enfermedades en hojas o tallos de agraz, estos géneros son *Alternaria sp.* con 3 especies patógenas, *Pestalotiopsis sp.* con 3 especies patógenas (11 aislamientos), *Epicoccum sp.* y *Fusarium sp.* con una especie patógena respectivamente (Tabla 3).

Al realizar el análisis bioinformático de las especies de *Pestalotiopsis* y a partir del árbol filogenético (figura 8) que de este análisis se logro obtener, se pudo determinar que las especies de *Pestalotiopsis sp.* se encuentran separadas en dos grandes grupos. Las secuencias de los aislados F12, E6 y D7 identificados como *Pestalotiopsis microspora* y A7, C5, A4 y F2

identificados como *Pestalotiopsis sydowiana - microspora*, se encuentran ubicadas en la segunda rama del árbol compartiendo un mayor grado de similitud con la secuencia de *Pestalotiopsis sydowiana* obtenida de la base de datos de NCBI taxonomy, esto puede ocurrir porque el gen que fue secuenciado usando los ITS 4 y 5 guarda mas similitud con esta secuencia (en el segundo grupo) que con *P. microspora*, por lo que se hace necesario analizar otros genes para separar estas especies. Respecto a las secuencias de A6, E1, C1 y A11 quienes aparecen en la misma rama donde se encuentra la secuencia (*Pestalotiopsis vismiae*) de comparación bajada de NCBI taxonomy, se puede afirmar que nuestros aislamientos comparten un alto grado de similitud con dicha secuencia. La ubicación de especies como *P. citrina* y *P. besseyi* ubicados en una rama externa a la que contiene todas las especies de *Pestalotiopsis* permite evidenciar una posible parafilia del clado que relaciona a estas especies en un mayor grado con *Truncatella megaspora* que con *Pestalotiopsis sp.* La ubicación de *Pestalotia bicolor* dentro del primer grupo del árbol, permite establecer que esta especie tiene mayor correlación genética con las especies de *Pestalotiopsis sp.* que la especie de *Monochaetia monochaeta* la cual queda en una rama disgregada de las especies de *Pestalotiopsis*.

Según lo reportan algunos autores que describen el género, una de las principales particularidades de este es que las especies pueden dividirse en dos grandes grupos, separadas morfológicamente por variaciones en la coloración de las conidias, las cuales pueden ser verde oliva o café, aunque no se logró establecer que esta característica variable sea un factor para que las especies estén separadas en el árbol ya que los aislamientos obtenidos en este análisis, podían presentar cualquiera de las dos coloraciones (existía variación de color entre las conidias de aislados de una misma especie) y ubicarse en cualquiera de los dos grupos.

Las lesiones causadas por las especies de *Alternaria sp.* van desde manchas foliares como es el caso de *Alternaria alternata* quien además causa necrosis al igual que *Alternaria tenuissima* y *Alternaria sp.*

Según lo reportado por Kifer y Morelet, 1999; *Alternaria sp.* es cosmopolita, generalmente patógeno, saprófito o parásito de algunas plantas. Como se muestra en la tabla 1 del Anexo II, se aislaron 4 especies de *Alternaria* en la localidad de Cajicá, las cuales al ser probadas a partir de los postulados de Koch dieron como resultado que solo 3 de éstas eran patógenas de agraz (*V. meridionale*). Las especies identificadas fueron *A. alternata* causante de lesiones como manchas foliares de color rojo intenso, en hojas como se pudo apreciar en la figura 9; necrosis causada posiblemente por el proceso de colonización del hongo sobre la hoja, además de clorosis (figura 10) ocasionada potencialmente por la invasión de las hifas del hongo al sistema vascular. Tanto la necrosis como la clorosis causada por este hongo inician en la base de la hoja (Pecíolo), lo que nos lleva a creer que esta *Alternaria* es un patógeno secundario de agraz que necesita una herida abierta para entrar al tejido, colonizar y producir lesión.

Alternaria tenuissima también fue aislada de agraz y se determinó que tiene la capacidad de producir necrosis tanto en hojas como en tallos (figura 11 y 12), a diferencia de la especie anterior, *A. tenuissima* produce la lesión en el punto de siembra del inóculo. Primero se produce el crecimiento masivo del micelio y posteriormente debajo de este se evidencia la necrosis del tejido. No se evidenció daño del diente teoide, como en otras muestras, por esto es posible deducir que esta especie de *Alternaria* es un patógeno primario, porque es capaz de penetrar el tejido y producir daño sin que haya una herida abierta. En tallos se observó el mismo comportamiento en la necrosis,

primero una gran colonización de micelio y posteriormente la necrosis. En ramas desprendidas no se observó ningún síntoma es posible que el tiempo de observación fue muy corto para ver los efectos del hongo (figura 13).

Con un aislamiento de *Alternaria* fue imposible determinar la especie porque había mucha variabilidad en la morfología y tamaño de las conidias. Este fue el caso de *Alternaria* sp. el cual tiene la capacidad de producir necrosis en hojas y tallo. Este último no presenta una coloración homogénea en la lesión como sí ocurre en las dos especies anteriores. La necrosis muestra una coloración café oscura y parches color café claro (producida por la descamación de la corteza del tronco, la cual se cae después del daño causado por la necrosis), como se puede ver en la figura 14, posterior a la necrosis ocurre la colonización del micelio del hongo. En hoja desprendida se observó el desarrollo de necrosis desde los extremos de la hoja hacia el centro de la misma (Figura 15), además de daños en dientes teoides, lo que permite deducir que *Alternaria* sp. es posiblemente un patógeno que tiene la capacidad de dañar las estructuras meristemáticas ubicadas en las aserraduras de las hojas, (diente teoide), para poder colonizar el tejido y producir daños en las plantas.

Otros resultados interesantes fueron los obtenidos con el complejo PST, que cuenta con 11 aislamientos patógenos, distribuidas en 3 especies que son *Pestalotiopsis sydowiana-microspora*, *Pestalotiopsis vismiae* y *Pestalotiopsis microspora*.

Espinoza *et al*, 2008 reportan que *Pestalotiopsis* sp. causa en arándanos necrosis de color que varía de rojos a marrones, se presentan en hojas y ramas. Por otra parte Wright, *et al*, (2005) reportan a *P. guepinii*, como

patógeno de arándanos en Argentina y se destaca por producir atizonamiento, manchas foliares (color marrón claro), además de puntuaciones rojizas y chancros particularmente en tallos. Algunos de estos resultados son consistentes con los encontrados en este estudio, principalmente se observaron 4 tipos de lesiones ocasionadas por *Pestalotiopsis* sp., que presuntamente generan daño vascular y atacan principalmente las nervaduras ocasionando clorosis (Figura 23) o cambio de color de las mismas ya sea a rojo como se aprecia en la figura 25 o a morado como en la figura 24. Este tipo de lesión ocurre posiblemente por la invasión del hongo en el sistema vascular. Otro tipo de lesión fue la necrosis, que a diferencia de lo que reportan Espinoza *et al* 2008, en este estudio se determinó que pueden ser negras, café en varias tonalidades y/o amarillas. Este cambio en la lesión puede deberse al efecto que tiene las diferentes especies de *Pestalotiopsis* sp. sobre diferentes especies del género *Vaccinium*. Un tercer síntoma fueron los chancros; estas lesiones se observaron solo en hojas y con la especie *P. sydobwiana – microspora* (aislamiento P9 – figura 22); ocasionado principalmente por la aparición de los acérvulos. Otro síntoma observado fue la aparición de manchas foliares, principalmente de color rojo intenso, además de puntuaciones rojas distribuidas irregularmente sobre el tejido y que le dan a la hoja una coloración rojiza (figura 17), esto concuerda con lo descrito por Wright *et al*, 2005 para *P. guepinii* afectando la especie *Vaccinium corimbosum*.

El aislamiento A4 de *P. sydobwiana – microspora*, presentó una particularidad en tallos, pues luego de producida la necrosis se observó una descamación o caída de la corteza del tallo, debido posiblemente al daño que causa la lesión sobre el tejido (figura 27).

Al hacer una revisión bibliográfica de las especies de *Pestalotiopsis* reportadas para Colombia, nos encontramos con que las especies encontradas por nosotros no están reportadas para el país. La posible explicación para esto puede radicar en la clasificación taxonómica del género, ya que muchas especies descritas en varios artículos fueron identificadas utilizando las claves de identificación taxonómica de Hunter *et al*, 1997 quien reconoce únicamente a *Pestalotia sp.*, sin separarla de *Pestalotiopsis*. Recordemos que aún cuando las diferencias morfológicas entre estos géneros son mínimas (Principalmente número de células centrales de las conidias y números de apéndices apicales), a nivel taxonómico son muy importantes, así que es posible que haya errores en la clasificación de estas especies.

Epicoccum nigrum es considerado por el departamento Plant Pathology del estado, de la Universidad de Michigan como un hongo post cosecha, poco importante que ataca el fruto pudriéndolo. Las lesiones encontradas en este estudio permitieron evidenciar que la acción de este patógeno es leve en hojas desprendida; produce principalmente clorosis en la nervadura central y en las laterales (figura 32) y también varios puntos cloróticos generalmente de gran tamaño (figura 33), al transcurrir las semanas se observó el cambio de coloración (clorosis de todo el tejido), esto puede ocurrir debido a que el hongo es capaz de invadir el sistema vascular de la planta y producir lesión, además se pudo observar en el ápice de las hojas de algunas plantas que fueron inoculados con esta especie puntos necróticos pequeños, pero al pasar de las semanas la lesión no prospero.

Con respecto a *Fusarium oxysporum*, no se evidenció daño significativo en hojas (figura 35), pero si en tallos donde produjo necrosis del tejido (figura 36). Tanto en hojas como en tallos se pudo notar la capacidad del hongo

para colonizar (realización de cortes a mano alzada, para observar el patógeno), pero en hojas los síntomas no fueron tan evidentes. Las especies de *Fusarium* son conocidas a nivel mundial por causar daños a muchas plantas ornamentales (clavel y rosa) y de alimentos (arroz y maíz), las lesiones varían dependiendo de las especies, este patógeno puede afectar cualquier órgano de la planta (semillas, tallos, hojas y raíces), el hongo coloniza principalmente el sistema vascular y presenta variación en los sistemas que van desde cambios leves de coloración en los órganos hasta necrosis de los tejidos. En los ensayos fue posible observar la variación de color de los tejidos de verde a un tono rojo leve, y la observación microscópica permitió evidenciar el patógeno dentro del tejido.

Otros resultados importantes encontrados en los procesos de germinación realizados con el fin de tener material vegetal para las pruebas de inoculación, fue el de *Curvularia* sp. y *Ulocladium* sp. figuras 38 – 40, como se evidencio en los resultados fue posible observar el daño causado principalmente a las plántulas, particularmente al sistema radicular, donde se podía presentar agayas o nódulos que afectaban el normal desarrollo de las mismas, al hacer observaciones microscópicas de raíz, hojas y semillas se encontraron hifas y conidias de ambas especies por lo que fue imposible determinar si uno de los dos producen la lesión, o si se necesita que se encuentren ambos sobre la planta para que se desarrolle la enfermedad. Las pruebas realizadas de manera independiente para cada hongo en muestras de hojas, tallos y ramas desprendidas no permitieron evidenciar daños en los diferentes órganos, es posible que a medida que la planta crece y los tejidos se vuelven mas duros (agraz es una planta semi-leñosa) se le dificulte mas a estos tipos de hongos colonizar y producir daños en los tejidos de esta especie de planta. Estos dos géneros son catalogados como mohos que causan daños principalmente en cucurbitáceas,

Respecto a la incidencia de los diferentes patógenos encontrados sobre las muestras se observó que en la primera inoculación, realizada entre abril y junio del 2008, el patógeno que mas porcentaje de muestras afectó fue la cepa de *P. sydowniana – microspora* (A7), con un 67% de daño en contraste con las cepas *Pestalotiopsis* F2, F12 Y *F. oxysporum* que no produjeron lesiones. La época de esta inoculación coincidió con una temporada invernal marcada y temperaturas bajas (datos de la estación meteorológica de Cajicá) que por lo general no favorece el desarrollo de algunos patógenos. En la segunda inoculación realizada entre enero y marzo del 2009, en la cual además de hojas se inocularon tallos y ramas desprendidas, el patógeno más agresivo fue nuevamente *P. sydowniana – microspora* (A7), además de *F.oxysporum* y *A. tenuissima* con un 100% de daño en troncos y ramas simultáneamente. Esto contrastó con el efecto del aislamiento de *Pestalotiopsis* A11, el cual no causó daño ni en hojas ni en troncos. En hojas, el mayor daño lo causarón los aislamientos de *Pestalotiopsis* E6 y *A. alternata*, mientras que los aislamientos de *Pestalotiopsis* A7 y A11 presentaron los porcentajes de daño más bajos, las barras de error de la figura 41 y 42 permiten evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos (diferentes patógenos inoculados). Patógenos como *Alternaria tenuissima* son mas efectivos produciendo lesiones en tallos y ramas que hojas, lo mismo se observó en el aislamiento F2 de la especie *Pestalotiopsis sydowniana – microspora*.

Respecto a la incidencia de los diferentes patógenos encontrados sobre las muestras se observó que en la primera inoculación, realizada entre abril y junio del 2008, el patógeno que mas porcentaje de muestras afectó fue la cepa de *P. sydowniana – microspora* (A7), con un 67% de daño en contraste con las cepas *Pestalotiopsis* F2, F12 Y *F. oxysporum* que no produjeron lesiones. La época de esta inoculación coincidió con una temporada invernal marcada y temperaturas bajas (datos de la estación meteorológica de Cajicá)

que por lo general no favorece el desarrollo de algunos patógenos. En la segunda inoculación realizada entre enero y marzo del 2009, en la cual además de hojas se inocularon tallos y ramas desprendidas, el patógeno más agresivo fue nuevamente *P. sydowiana – microspora* (A7), además de *F.oxysporum* y *A. tenuissima* con un 100% de daño en troncos y ramas simultáneamente. Esto contrastó con el efecto del aislamiento de *Pestalotiopsis* A11, el cual no causó daño ni en hojas ni en troncos. En hojas, el mayor daño lo causarón los aislamientos de *Pestalotiopsis* E6 y *A. alternata*, mientras que los aislamientos de *Pestalotiopsis* A7 y A11 presentaron los porcentajes de daño más bajos, las barras de error de la figura 41 y 42 permiten evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos (diferentes patógenos inoculados). Patógenos como *Alternaria tenuissima* son mas efectivos produciendo lesiones en tallos y ramas que hojas, lo mismo se observó en el aislamiento F2 de la especie *Pestalotiopsis sydowiana – microspora*.

La variación en la incidencia de los patógenos sobre el hospedero puede estar directamente relacionada con el tipo de órgano que fue inoculado, ya que se pudo evidenciar en las pruebas que un mismo patógeno podía actuar de manera diferente dependiendo del órgano de la planta que estuviera colonizando, la severidad del patógeno también vario con los aislados. Evidenciando que algunos aislados que pertenecían a una misma especie podían presentar niveles diferentes en la escala de severidad, en los diferentes órganos inoculados. Los órganos mas afectados fueron las hojas y los tallos, rara vez las ramas desprendidas y las plantas, esto podría evidenciar que los patógenos aprovechan la presencia de una herida en el órgano para entrar y colonizar, dificultándose el mismo proceso en las plantas.

Al analizar los datos suministrados por la estación meteorológica de la facultad de ciencias de la Universidad Militar, ubicada en Cajicá, se pudo determinar que en las dos temporadas en las que se realizaron las pruebas de patogenicidad no existieron diferencias muy significativas en cuanto a la temperatura del aire y a la humedad relativa (sección 3.5 de resultados), por lo que es poco probable que este factor influenciara en la patogenicidad de algunos aislamientos como es el caso del aislamiento F2 de *Pestalotiopsis sydowiana* – *microspora* el cual en la primera prueba de patogenicidad no produjo lesiones pero en la segunda fue uno de los más agresivos. La segunda inoculación coincidió con la época de floración y fructificación de las plantas, por lo que podría ser que este aislamiento ataque solo en esta época del año o que al momento de realizar la primera inoculación dicho aislamiento estaba inactivo.

En la tabla 5 se muestra las especies y aislamientos encontradas por localidad, que resultaron ser patógenas, como se observa allí las especies más persistente por encontrarse en las 3 localidades fueron las de *Pestalotiopsis* sp, lo que permitiría afirmar que es posible que agraz sea una fuente importante para esta especie ya que le brinda los recursos necesarios para su desarrollo.

5. CONCLUSIONES

Pestalotiopsis sp. puede ser considerado como un patógeno de gran importancia en plantas de agraz (*V. meridionale*) debido a los daños que causa sobre las plantas, la severidad que presenta en la mayoría de los aislamientos que se evaluaron y a la persistencia del patógeno en las diferentes localidades analizadas.

Al igual *Alternaria* sp. Puede considerarse un patógeno importante en agraz (*V. meridionale*) por los daños que este genera; aunque durante el análisis de las localidades este solo se encontró presente en una localidad.

Para el caso de *Fusarium oxysporum* presenta acción patogénica sobre tallos aunque esta característica patógena no se logró evidenciar de manera clara sobre hoja.

Los resultados obtenidos del cladograma nos muestran que el gen amplificado no nos permite separar los aislamientos que tenemos a nivel de especies por lo que sería conveniente realizar otras pruebas para llegar a su diferenciación.

6. RECOMENDACIONES

Realizar más estudios que permitan establecer otros patógenos de agraz, tanto hongos filamentosos, como levaduriformes, bacterias y virus.

Repetir las pruebas moleculares aplicando primers para la subunidad ribosomal 18SrRNA con el fin de lograr separar las especies estrechamente relacionadas del género *Pestalotiopsis*.

También es recomendable realizar cortes histológicos que permitan observar en que estructura (tejido) es capaz de producir lesión los diferentes patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

Arjona BB. 2001. El Mortiño o Agraz (*Vaccinium meridionale*, *Ericaceae*) como Planta Promisoria en la Región del Parque Arvíl (Antioquia, Colombia). Memorias del Seminario de Plantas Promisorias. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional, Seccional Medellín.

Ávila H. G., Cuspoqa J. A., Fischer G., Ligarreto G. A. y Quicazán M. C. 2007. Caracterización Físicoquímica y Organoléptica del Fruto de Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) Almacenado a 2°C. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. 60, (2):.4179-4193.

Barnet, H.L. and Hunter, B.B., 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi (4th ed.), The American Phytopathological Society Press, St. Paul.

Canter H & Edzard E, 2004. Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (Bilberry) for night vision. A systematic review of placebo controlled trials. Survey of Ophthalmology. 49, (1): 38-50.

Castaño Zapata, J., Del Río Mendoza L. & Acosta A. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Primera edición. Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias Departamento de Fitotecnia.

Castrillón J., Carvajal E., Ligarreto G. y Magnitskiy S.. 2008. El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) en diferentes sustratos. Agronomía Colombiana 26(1): 16-22.

Corantioquia, 2002. CONOZCAMOS Y USEMOS EL MORTIÑO. Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia. 1 edición. Medellín.

Dhingra, O., J. Sinclair. 1995. Basic plant pathology methods. 2nd edition. Lewis Publishers Boca Raton.

Espinoza G. J., Briceño X. E., Keith L. M. and Latorre B. A. 2008. Canker and Twig Dieback of Blueberry Caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Plant Disease Oct 2008, Volume 92, Number 10: 1407-1414

Fernández J., Martínez C., Martín P. 2004. Sintomatología e Incidencia de Enfermedades Ocasionadas por *Alternaria tenuíssima* y *Pestalotiopsis guepin* Sobre Órganos Vegetativos de Plantas de Aarándano (*Vaccinium corymbosum*). San Martín. Extensión HET-30

Jay W, 2006. Guía en línea de control de enfermedades de plantas. (Blueberry -- Godronia Canker). Universidad del Estado de Oregon. USA.

Judd W.S et al. 1999. Plant Systematics, A phylogenetic approach. 1 edition. Sinauer Ed. USA

Kiffer E. & Morelet M., 1999. The Deuteromycetes: Mitosporic Fungi, classification and generic keys. 1 edition. Science publishers. USA

Lambert D, 1987. Extension Blueberry Specialist. Departamento de Agricultura. Universidad de Maine, Orono. U.S ME 04469

Marroquín J.S, Cano G, 1994. Taxonomía de plantas superiores. Editorial Trillas. México D.F.

Narayanasamy P, 2001. Plant pathogen detection and disease diagnosis. 2nd Edition. Ed, Marcel Dekker. New Cork.

National Research Council (1989). Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes With Promise for Worldwide Cultivation. Washington DC: National Academies Press.

Ramsdell D. C., 2000. Blueberry diseases in Michigan. Department of Botany & Plant Pathology. Michigan State University Extension. Bulletin E-1731.

Ramsdell D. C., 2003. Michigan blueberry facts. Department of Botany & Plant Pathology. Michigan State University.

Schaad, N. W., J.B. Jones, W. Chun. 2001. Plant pathogenic bacteria. Laboratory guide for identification. 3rd edition. APS Press St. Paul, Minnesota. USA.

Wharton P. & Schilder A., 2003. Michigan blueberry facts. Blueberry Fruit Rot Identification Guide. Dept. of Plant Pathology, Michigan State University. Michigan State University. Extension Bulletin E-2847

CONSULTA VIRTUAL

Centro de Excelencia Fitosanitaria, 2004. Boletín Informativo No. 9. Subcentro de Sistemas de Información. Distribución de Agraz o Mortiño (*Vaccinium* spp.) en Antioquia. www.ica.gov.co/cef. Accedida 20 julio 2006.

Centro de Excelencia Fitosanitaria, 2006. Boletín Informativo No. 11. Subcentro de Sistemas de Información. Distribución de Agraz o Mortiño (*Vaccinium* spp.) en Antioquia. www.ica.gov.co/cef. Accedida 20 julio 2006.

Dereeper et al, 2008. *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist*. Nucleic Acids Res. 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19. Accedida el 10 de febrero 2009. www.phylogeny.fr

Kahlon T.S & Smith G.E, 2005. In vitro binding of bile acids by blueberries (vaccinium plums (Prunus spp.), prunes (prunus spp.), strawberries (fragaria ananassa), cherries (malpighia punicifolia), cranberries (vaccinium macrocarpon) and apples (malus sylvestris). Quimica de la comida. Centro de busqueda regional del oeste. Estados Unidos. www.elsevier.com/locate/foodchem

Kontioakaria, 2004. Cranberry Juice and Bacterial Colonization in Children – a Placebo - Controlled Randomized Trial. Departamento de pediatria, Universidad de Oulu finlandia. Departamento de microbiologia medica. Universidad de Turku Finlandia. Nutrición clínica, pag: 1065 – 1072. <http://intl.elsevierhealth.com/journals/cinu>. Consultado agosto 11 de 2006.

Luteyn J. L. 2002. Neotropical Blueberries. Publicación en Internet; <http://www.nybg.org/bsci/res/lut2> . Accedida 25 julio 2006.

Lorentzen et al, 2009 Lorentzen et al, 2009. CLC Genomics Workbench. Version 3.0. www.clcbio.com Accedida el 10 de febrero del 2009.

Proexantec, 2006. Hoja Técnica del mortiño (arándano: Andean Blue Berry). Corporación Proexantec, promoción de exportaciones agrícolas no tradicionales. www.proexantec@porta.net

Tenenbaum. F. 1997. Dictionary for Gardeners definition of *Vaccinium*. Taylor's Dictionary for Gardeners. Houghton Mifflin Company. www.answers.com/topic/vaccinium-1.

Somrithipol et al, 2002. A Preliminary Survey of Coelomycetes in Thailand. Mycology Laboratory, the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Thailand. mycology.biotec.or.th/.../fig9.2B.gif. Accedido 15 octubre 2006.

Wright E, 2005. Conocimiento actual sobre las enfermedades del arándano. Cátedra de Producción Vegetal. Fac. de Agronomía. UBA. Av. San Martín 4453. Buenos Aires, Argentina. Wright@agro.uba.ar.

ANEXO I.

Características generales (macroscópicas y microscópicas) de los hongos aislados.

I.I. Descripción general de *Alternaria* sp.

Características

Hongo filamentoso que presenta conidióforos simples, tabicados. En el extremo de los conidióforos se produce la formación de conidios muriformes, de color café los cuales presentan septos transversales y verticales con disposición irregular. La célula conidiógena simpodial produce los conidios que se organizan en formas de largas cadenas Kiffer *et al.* (1999).

I.I.I. *Alternaria alternata*

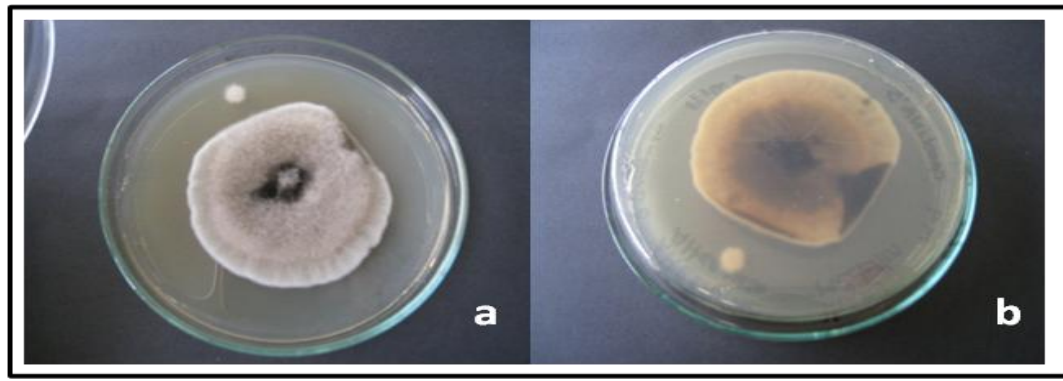


Figura I. Colonia de *A. alternata*, creciendo en medio PDA $\frac{1}{2}$ de concentración. a) Colonia aterciopelada color gris claro; b) reverso de la caja presenta colores que van desde el café claro hasta el beige oscuro, su borde puede tornarse negro a medida que la colonia envejece. Muestra aislada de hojas. Imágenes tomadas a 15 días de crecimiento, a 27°C.

I.I.II. *Alternaria tenuissima*

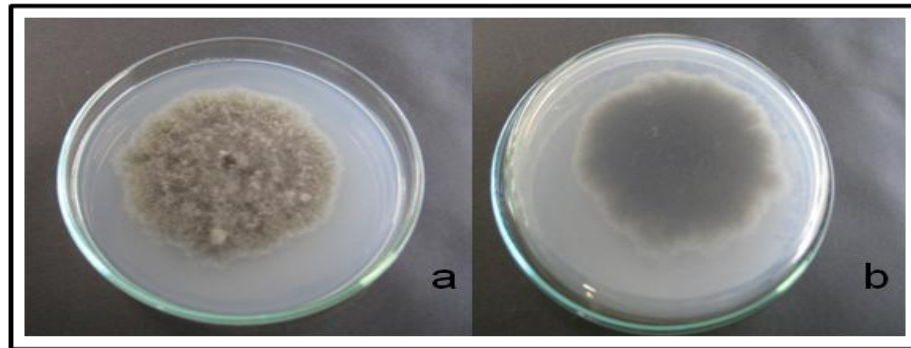


Figura II. Colonia de *A. tenuissima*, creciendo en PDA a $\frac{1}{2}$ de concentración. a) Colonia algodonosa gris de color homogéneo, b) Reverso de la colonia color negro. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C.

I.I.III. *Alternaria sp.*

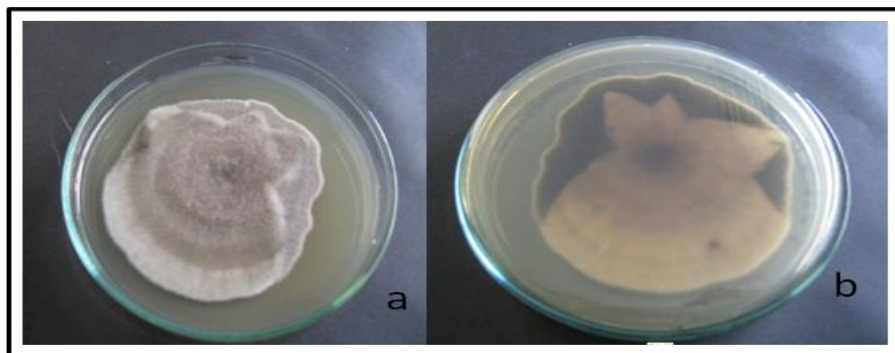


Figura III. Colonia de *Alternaria sp.*, creciendo en PDA a $\frac{1}{2}$ de concentración. a) Colonia aterciopelada, gris claro; b) Reverso de la colonia, gris claro en la parte media y baja y negra en la parte superior. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C.

I.II. Descripción general de *Pestalotiopsis* sp.

Características

Tiene una distribución cosmopolita, este género comprende 48 especies, que son generalmente parásitas o endofíticas que se ubican en diferentes órganos de una gran variedad de plantas, su estado Teleomorfo es *Pestalosphaeria*. Presenta relación con varios géneros de estado anamorfo entre ellas *Bromella* (*Pestalotia*). (Somrithipol et al, 2002; Kiffer & Morelet, 1999).

Presenta conidióforos cortos, anélidos, simples y oscuros producidos en estructuras fructíferas compactas pueden ser un acérvulo o picnidio, además de phragmoconidio, con conidios multicoloreados o café que presentan de 4 a 5 septos transversales y con varios apéndices apicales hialinos (3), endógeno con apéndice basal céntrico, o sin él; tiene varias células, hialino, termina en punta, es elipsoide a fusoides. (Barnet & Hunter, 1998; Kiffer & Morelet, 1999).

I.II.I. *Pestalotiopsis microspora* - *sidowiana*. (A4)

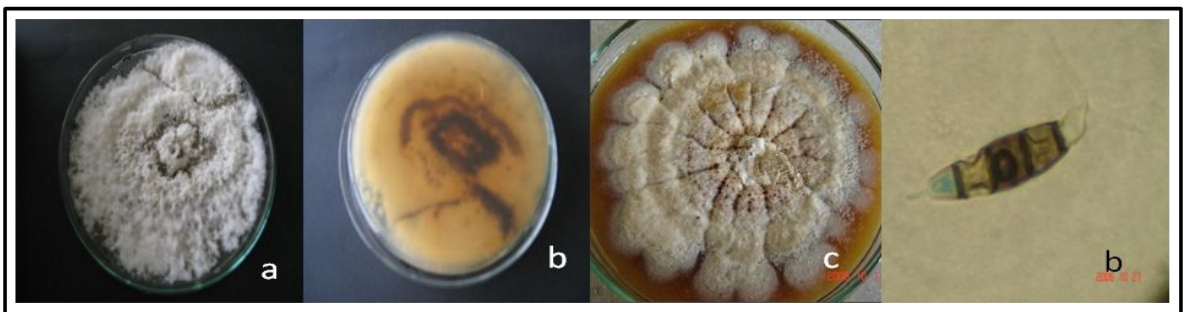


Figura IV. Colonia de *P. microspora* - *sidowiana* en diferentes medios. a) y b) Colonia creciendo en PDA $\frac{1}{2}$ de concentración. Micelio aéreo blanco, con centro que presenta un anillo de color café oscuro donde se encuentran

picnidios. Al reverso se observa la colonia de color blanco con borde café oscuro. c) Colonia creciendo en agar malta $\frac{1}{4}$ de concentración. Crecimiento liso – glabra, amarillo muy claro en el centro, borde blanco, crecimiento circular, estriado en forma de flor, exudados amarillos. Reverso café claro a amarillo, estriado irregular en el centro; d) Conidia típica de *Pestalotiopsis*, observada en microscopio de luz a 40x. Muestra aislada de troncos. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C.

I.II.III. *Pestalotiopsis* sp. (A21)

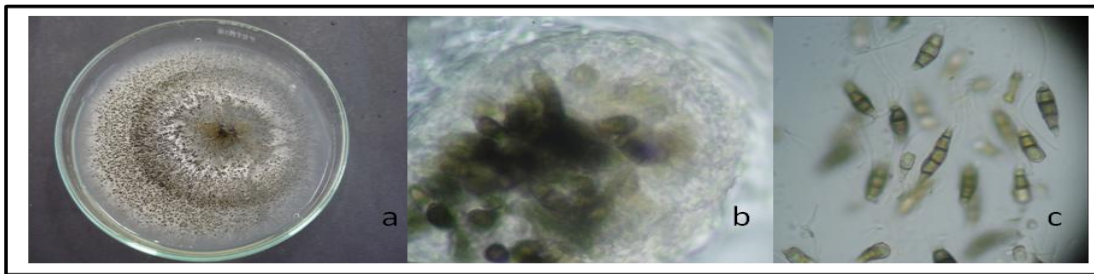


Figura V. Colonia de *Pestalotiopsis* sp y estructuras reproductivas. a) Colonia glabra color blanco, múltiples puntos de fructificación; Imágen tomada a los 15 días de crecimiento, a 27°C. b) Estroma producido por *Pestalotiopsis* sp. en medio de cultivo; c) Conidias típicas del hongo. b y c) Imágenes tomadas con microscopio de luz a 40x

I.II.III. *Pestalotiopsis microspora* (D7)

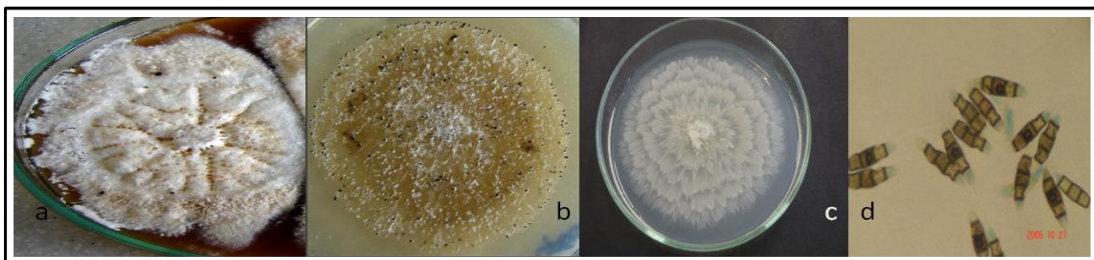


Figura VI. Crecimiento de *P. microspora* en diferentes medios. a) Colonia en agar malta $\frac{1}{4}$ de concentración; glabra de color blanco que presenta exudados amarillos, presenta estriaciones desde el centro hacia el borde de la colonia. b) Crecimiento de colonia en PDA $\frac{1}{2}$ concentración, la colonia presenta picnidios color negro, es de color amarillo; c) Colonia en PDA $\frac{1}{4}$ concentración, colonia glabra, blanca, crecimiento asemeja una flor. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C . d) Conidias típicas del hongo, imagen tomada con microscopio de luz a 40x. Muestra aislada de troncos.

I.II.IV. *Pestalotiopsis microspora* (F12)

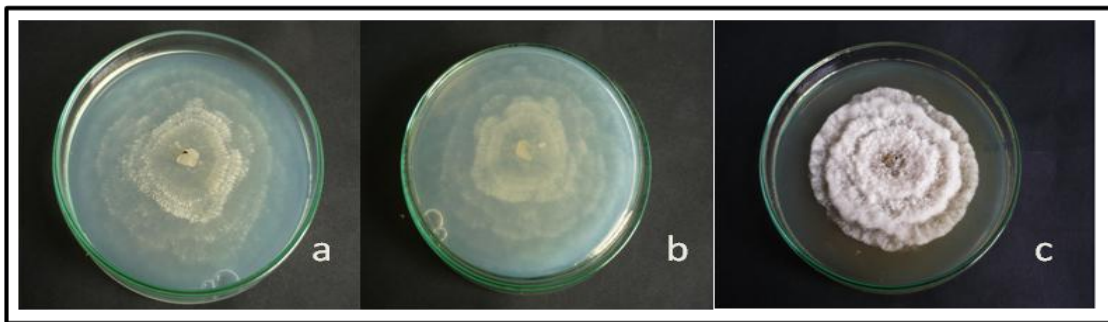


Figura VII. Crecimiento de *P. microspora* en diferentes medios. a) Colonia en PDA $\frac{1}{4}$ de concentración, glabra, color blanco; b) Reverso, coloración blanca; c) Colonia en agar malta $\frac{1}{4}$ concentración, aterciopelada, blanca. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C .

I.II.V. *Pestalotiopsis sydowiana* – *microspora* (F2)



Figura VIII. Colonia de *P. sydowiana* – *microspora* (F2) creciendo en diferentes medios. a) Colonia creciendo en PDA $\frac{1}{2}$ concentración, aterciopelada, blanca, crecimiento en forma de flor; b) reverso blanco, se observan anillos de crecimiento; c) Crecimiento en agar malta $\frac{1}{4}$ de concentración, aterciopelada blanca. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C.

I.II.VI. *Pestalotiopsis vismiae* (A11)

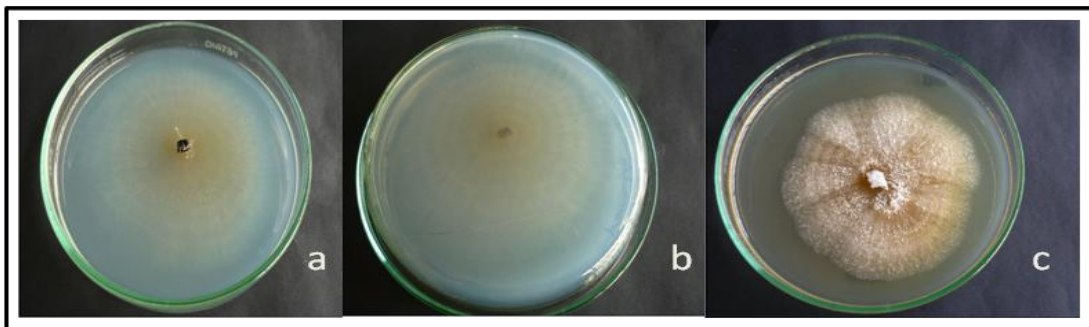


Figura IX. Colonia de *P. vismiae* creciendo en diferentes medios. a) Colonia en PDA $\frac{1}{4}$ de concentración, glabra, color amarillo en el centro y blanco en los bordes; b) reverso de la colonia, color blanco, c) colonia en agar malta $\frac{1}{4}$ de concentración, aterciopelada, colores blanco y café claro, crecimiento en forma de anillos. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C.

I.II.VII. *Pestalotiopsis vismiae* (E1)

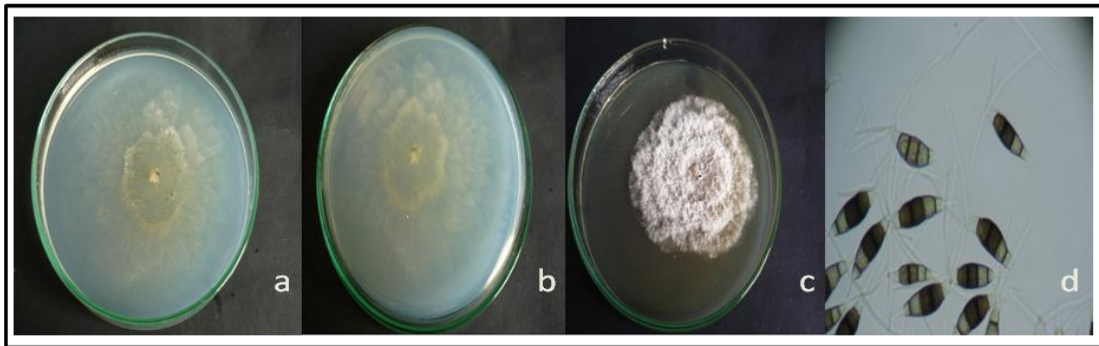


Figura X. Colonia de *P. vismiae* creciendo en diferentes medios. a) Colonia en PDA $\frac{1}{4}$ de concentracion, glabra, color amarillo en el centro y blanco en los bordes; b) reverso de la colonia, color blanco en bordes y amarillo en centro, c) colonia en agar malta $\frac{1}{4}$ de concentracion, aterciopelada, color blanco. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C. d) conidias típicas de este hongo, imagen de microscopio de luz a 40x.

I.II.VIII. *Pestalotiopsis* sp. (3)

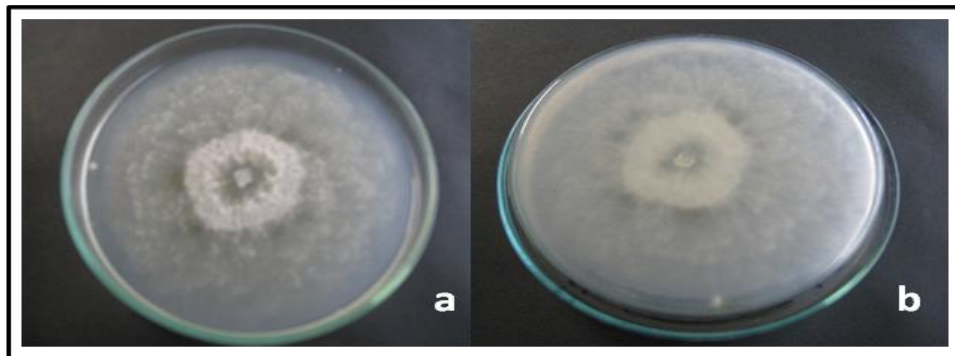


Figura XI. Colonia de *Pestalotiopsis* sp. creciendo en diferentes medios. a) Colonia en PDA $\frac{1}{4}$ de concentracion, glabra, color blanco intenso en el centro y mas claro en los bordes; b) reverso de la colonia, color blanco denso en centro y mas claro en los bordes. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C.

I.II.IX. *Pestalotiopsis vismia – hanseni* (C1)

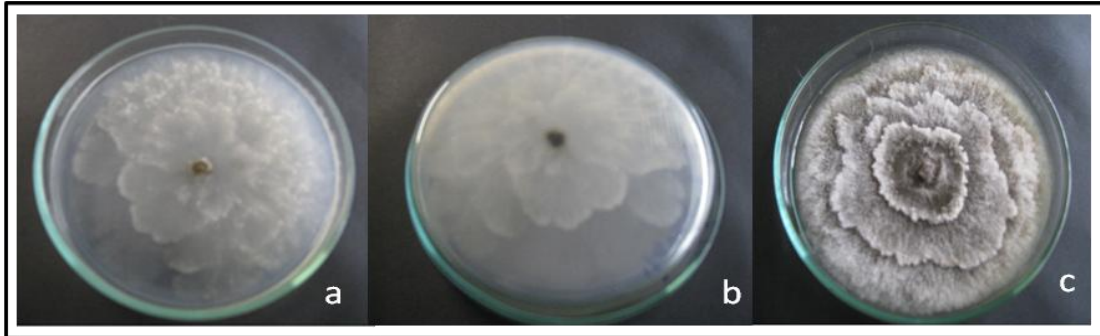


Figura XII. Colonia de *Pestalotiopsis vismia – hanseni* creciendo en diferentes medios. a) Colonia en PDA $\frac{1}{4}$ de concentracion, glabra, blanca, crecimiento semejando una flor; b) reverso de la colonia, blanco; c) colonia en agar malta $\frac{1}{4}$ de concentracion, aterciopelado, blanco con visos café (Puntos de fructificacion del hongo). Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C.

I.II.X. *Pestalotiopsis sydowiana – microspora* (P9)

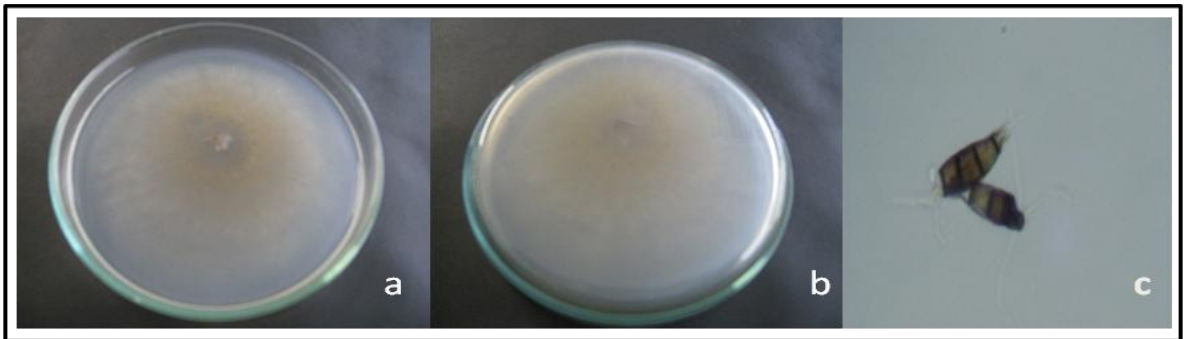


Figura XIII. Colonia de *Pestalotiopsis sydowiana – microspora* creciendo en PDA $\frac{1}{4}$ de concentracion. a) Colonia glabra, centro amarillo, bordes blancos; b) reverso de la colonia, centro amarillo, bordes blancos, Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C. c) conidias típicas del hongo, imágenes tomadas en microscopio de luz a 40x.

I.II.XI. *Pestalotiopsis* sp. (C5)

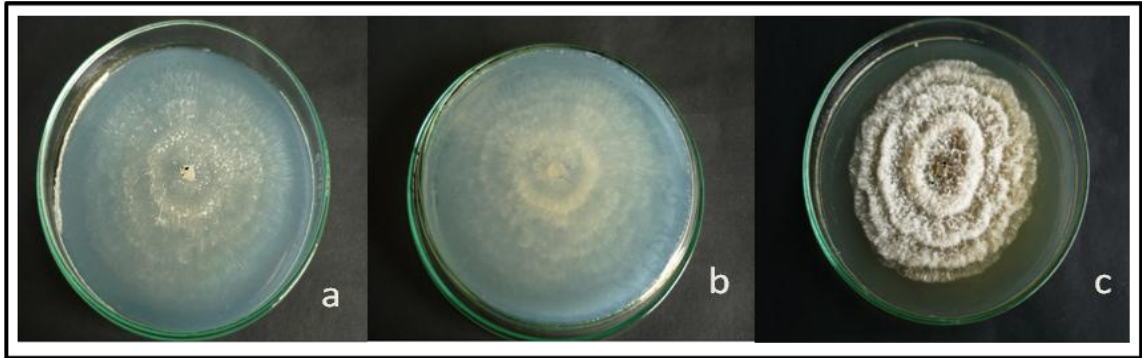


Figura XIV. Colonia de *Pestalotiopsis* sp. (C5) creciendo en diferentes medios. a) colonia glabra, blanca; b) reverso de la colonia, color blanco; c) colonia en agar malta $\frac{1}{4}$ de cocentracion, crecimiento aterciopelado, blanco, mas larga que ancha. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C .

I.II.XII. *Pestalotiopsis sydowiana* – *microspora* (A9)

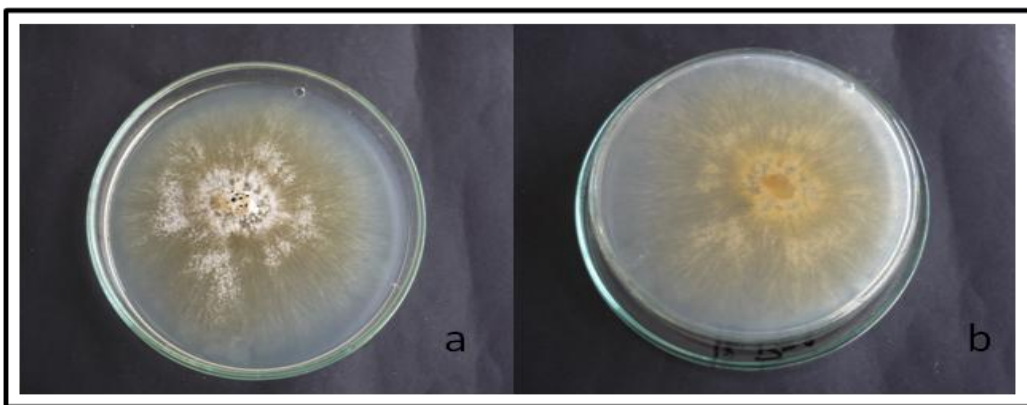


Figura XV. Colonia de *Pestalotiopsis sydowiana* – *microspora* (A9) creciendo en PDA $\frac{1}{4}$ de concentración. a) Colonia aterciopelada blanca en el centro y amarilla en los borde, b) reverso de la colonia, amarillo en el centro y blanco en los bordes. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C .

I.III. *Epicoccum nigrum*

Características

Esporodocio oscuro (café), de forma globosa, tamaño variable, presenta conidioforos compactos o individuales, cortos y oscuros, conidia café, dictiosporas globosas, hifas septadas, al igual que sus conidias, es un hongo poco. Resulta un hongo interesante por ser un agente alergénico y hasta tóxico para los humanos (Kiffer & Morelet). (Barnet & Hunter, 1998). Muestra aislada de tronco y hojas de agraz. La colonia tiene micelio algodonoso blanco a rosado, que presenta cuerpos fructíferos color café a marrón.

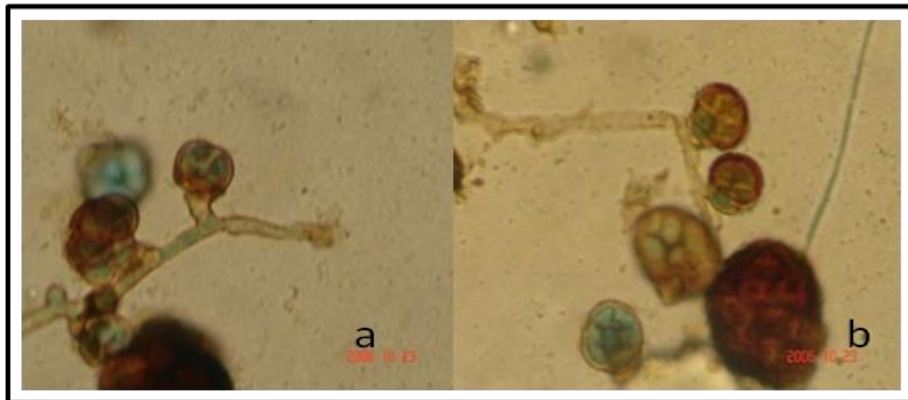


Figura XVI. Conidias de *E. nigrum* unidas a las hifas. a) Imagen a 10x del microscopio, b) Imagen a 40x del microscopio.

I.IV. *Fusarium oxysporum*

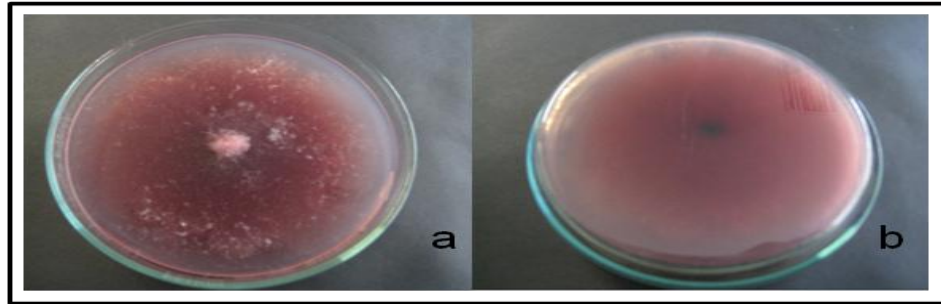


Figura XVII. Colonia de *Fusarium oxysporum* creciendo en PDA $\frac{1}{4}$ de concentración, a) colonia algodonosa de color rojo sobre el medio, parches con micelio blanco, b) reverse de la colonia, pigmentación roja. Imágenes tomadas a los 15 días de crecimiento, a 27°C.

ANEXO II

Listado de hongos aislados

Tabla I. Listado de hongos aislados salida de campo 1

Actual nomenclatura	Explanete de origen	Nombre científico	Condicion
A1	Troncos		NP
A2	Troncos		NP
A3	Troncos		NP
A4	Troncos	<i>P. sidowiana - microspora</i>	P
A5	Troncos		NP
A6	Troncos	<i>P. vismia</i>	NP
A7	Troncos	<i>P. sodowiana - microspora</i>	P
A8	Troncos		NP
A9	Troncos	<i>P. sidowiana - microspora</i>	P
A10	Troncos		NP
A11	Hojas	<i>P. vismia</i>	P
A12	Hojas	<i>Epicocum nigrum</i>	P
A13	Flores		NP
A14	Flores		NP
A15	Flores		NP
A16	Flores		NP
A17	Flores		NP
A18	Flores		NP
A19	Flores		NP
A20	Fruto		NP
A21	Troncos		NP

E1	Troncos	<i>P. vismia</i>	P
E2			NP
E3	Hojas		NP
E4	Troncos		NP
E5	Hojas		NP
E6		<i>P. microspora</i>	P
E7			NP

Nota: las siglas Np y P, significan no patógeno y patógeno, respectivamente.

Tabla II. Listado de hongos aislados salida de campo 2

Actual nomenclatura	Explante de origen	Nombre científico	Condicion
SALIDA DE CAMPO 2			
B1	Troncos		NP
B2	Troncos		NP
		<i>P. vismia -</i>	
C1	Troncos	<i>hanseni</i>	P
D1	Hojas		NP
D2	Hojas		NP
D3	Hojas		NP
D4	Troncos		NP
D5	Troncos		NP
D6	Troncos		NP
D7	Hojas	<i>P. microspora</i>	P
D8	hojas		NP

Nota: las siglas Np y P, significan no patógeno y patógeno, respectivamente.

Tabla III. Listado de hongos aislados salida de campo 3

Actual nomenclatura	Explanete de origen	Nombre científico	Condición
SALIDA DE CAMPO 3			
F1	Tallo		NP
		<i>P. sydowiana</i> -	
F2	Hojas	<i>microspora</i>	P
F3	Tallo		NP
F4	Tallo	<i>Fusarium oxysporum</i>	P
F5	Hojas		NP
F6	Hojas		NP
F7	Hojas		NP
F8	Hojas		NP
F9	Hojas		NP
F10	Tallo		NP
F11	Hojas		NP
F12	Hojas		NP
F13	Tallo		NP
F14	Tallo	<i>P. microspora</i>	NP
F15	Hojas		NP
F16	Hojas		NP
F17	Hojas		NP
M1	Hojas	<i>Alternaria alternata</i>	P
M2	Hojas	<i>Alternaria tenuissima</i>	P
M3	Hojas	<i>Alternaria sp.</i>	P

Nota: las siglas Np y P, significan no patógeno y patógeno, respectivamente.