

**CARACTERIZACIÓN Y MANEJO QUÍMICO DE AISLADOS DE *Colletotrichum* spp.
CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL ÑAME (*Dioscorea* spp.) EN EL
DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA**

JHOANDYS DE JESÚS ROYET BARROSO

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS
MONTERÍA – CÓRDOBA
2022**

**CARACTERIZACIÓN Y MANEJO QUÍMICO DE AISLADOS DE *Colletotrichum* spp.
CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL ÑAME (*Dioscorea* spp.) EN EL
DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA**

JHOANDYS DE JESÚS ROYET BARROSO

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Master en Ciencias
Agronómicas, Énfasis en Sanidad vegetal**

**DIRECTOR:
RODRIGO ORLANDO CAMPO ARANA, I.A. PhD.
Profesor Titular Facultad de Ciencias Agrícolas - Universidad de Córdoba**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS
MONTERÍA - CÓRDOBA
2022**

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del proyecto serán responsabilidad del autor.

Artículo 17, acuerdo No. 039 del 24 de Junio de 2005 del Consejo Superior de la Universidad de Córdoba.

Nota de aceptación

RODRIGO ORLANDO CAMPO ARANA. PhD

Director

MANUEL JOSÉ PELÁEZ PELÁEZ. PhD

Jurado

OSCAR ALBERTO BURBANO FIGUEROA. PhD

Jurado

Montería, abril de 2022

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a todas las personas que influenciaron en mi vida, dándome buenos consejos, enseñanzas y que han forjado todo lo que soy hoy en día, con todo mi corazón y afecto se lo dedico a: Nélida, Milciades, Margarita, Yeison, Gina y Jesé.

Jhoandys Royet Barroso

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, por ser esa fuente inspiración para seguir adelante a pesar de las adversidades que se presentaron durante el proceso de formación.

Quiero expresar mis agradecimientos a mi alma mater, la Universidad de Córdoba, a los docentes del programa de Maestría en Ciencias Agronómicas, a mis compañeros de la cohorte, a los trabajadores del laboratorio de Fitopatología y Biología molecular de la facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba.

Un agradecimiento especial a mi director de tesis Rodrigo Orlando Campo Arana, a mis asesores Manuel José Peláez y Oscar Burbano Figueroa, gracias por las sugerencias y los consejos dados para llevar a cabo este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
1. INTRODUCCIÓN	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. MARCO TEÓRICO	17
4.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE ÑAME.....	17
4.2. LIMITANTES DEL CULTIVO.....	19
4.3. LA ANTRACNOSIS	20
4.3.1. Etiología o agente causal.....	20
4.3.2. Biología de <i>Colletotrichum</i> spp.....	21
4.3.3. Síntomas de la antracnosis en ñame	23
4.3.4. Caracterización e identificación del genero <i>Colletotrichum</i>	25
4.3.5. Manejo de la antracnosis	26
3.5.1. Sensibilidad de <i>Colletotrichum</i> spp a fungicidas	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1. LOCALIZACIÓN	28
5.2. PROCEDIMIENTO	28
Objetivo 1.Relacionar los diferentes síntomas de la antracnosis del ñame, con la morfología de los diferentes aislados de <i>Colletotrichum</i> spp., asociados con la enfermedad.	28
a) Descripción de síntomas de antracnosis en ñame.	28
b) Obtención de aislamientos monospóricos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	28
c) Características macroscópicas de la colonia.	29
d) Características microscópicas de la colonia.	29
e) Patogenicidad de los aislados.	29
Objetivo 2. Determinar la variabilidad genética de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. mediante la secuenciación de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS).	31
a) Extracción de ADN	31
b) Amplificación y secuenciación de Espaciadores Internos Transcriptos (ITS)	31
c) Análisis filogenético	32
Objetivo 3. Hacer estudios básicos de sensibilidad a fungicidas de aislados del patógeno.	32
a) Inhibición del crecimiento micelial.....	32
b) Inhibición de la germinación de conidias	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
7. CONCLUSIONES	70
8. RECOMENDACIONES	71
9. BIBLIOGRAFÍA	72

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Producción, Área y rendimiento del cultivo de ñame a nivel mundial (FAO, 2020).....	17
Tabla 2. Área, producción y rendimiento del cultivo de ñame en Colombia por departamento (Agronet, 2018).....	19
Tabla 3. Escala de severidad para evaluar el porcentaje de severidad y determinar el grado de resistencia del genotipo (Nwadili <i>et al.</i> , 2017).	30
Tabla 4. Cebadores utilizados para la ampliación y secuenciación de la región ITS.	32
Tabla 5. Fungicidas seleccionados para la evaluación in vitro de su eficacia en el control de aislamientos fúngicos asociados a antracnosis en ñame (<i>Dioscorea</i> spp).....	33
Tabla 6. Aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. colectados de plantas de ñame.	37
Tabla 7. Rango de hospederos de 11 aislados de <i>Colletotrichum</i> sobre accesiones de ñame.....	42
Tabla 8. Análisis de varianza para la variable severidad de la antracnosis: Los valores de severidad se han reemplazado por rangos.....	43
Tabla 9. Clasificación de la resistencia de siete accesiones de ñame, a 11 aislamientos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> inoculadas en hojas, bajo condiciones de laboratorio.....	48
Tabla 10. Valor de la dosis letal al 50% (DL ₅₀) de seis fungicidas sobre la supresión del crecimiento micelial de aislados de <i>Colletotrichum</i>	60

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Ciclo de vida de especies de <i>Colletotrichum</i> (De Silva <i>et al</i> , 2017)	22
Figura 2. Síntomas de antracnosis en el cultivo de ñame (Ayodele <i>et al.</i> , 2006).....	24
Figura 3. Síntomas de antracnosis asociadas al cultivo de ñame.....	36
Figura 4. Dendrograma de las variables morfológicas de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. del cultivo de ñame.....	38
Figura 5. Síntomas de antracnosis en hojas de ñame <i>Dioscorea alata</i> , en cámara húmeda, ocho días después de la inoculación con aislados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	41
Figura 6. Virulencia de 11 aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. sobre siete accesiones de ñame.....	44
Figura 7. Resistencia de siete genotipos de ñame a 11 aislados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	45
Figura 8. Efecto de la interacción genotipo y aislado sobre la severidad de la enfermedad.	47
Figura 9. Amplificación de aislados del género <i>Colletotrichum</i> asociados al cultivo de ñame con cebadores ITS3 e ITS4.	49
Figura 10. Árboles filogenéticos basado en la secuenciación parcial de genes ITS de especies de <i>Colletotrichum</i> y una especie externa (<i>Cercospora beticola</i>).	50
Figura 11. Efectos principales: fungicida, dosis y aislados, sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp..	54
Figura 12. Crecimiento de aislados de <i>Colletotrichum</i> sobre PDA modificado con diferentes dosis de fungicidas.	55
Figura 13. Efecto de la interacción dosis y fungicidas sobre la inhibición del crecimiento micelial de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp.	57
Figura 14. Efecto de la interacción entre fungicidas y aislados sobre la inhibición del crecimiento micelial.	57
Figura 15. Efecto de la interacción dosis y aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. sobre la inhibición del crecimiento micelial.....	58
Figura 16. Efecto de fungicidas sobre la germinación de conidias de <i>Colletotrichum</i> spp. usando el valor de absorbancia a 450nm.....	66
Figura 17. Efecto de la interacción entre el fungicida y aislado sobre la germinación de <i>Colletotrichum</i> spp. usando el valor de absorbancia a 450nm.	67

RESUMEN

El cultivo de ñame es de gran importancia para la economía de los países tropicales y subtropicales ubicados en África, Asia, América central y del sur, hace parte de la dieta humana, siendo valorado por su aporte de carbohidratos y vitaminas. Las especies más sembradas se han visto afectadas por problemas fitosanitarios causados por hongos y virus; donde la enfermedad más limitante es la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), causando pérdidas hasta de un 85%. El manejo de la enfermedad se ha hecho mediante la aplicación de fungicidas y prácticas culturales sin alcanzar un manejo eficaz de esta; debido al desconocimiento de la enfermedad y el aumento de los niveles de resistencia del género a diferentes fungicidas, en este sentido, el monitoreo de la resistencia a los fungicidas es crucial para lograr un manejo efectivo de la enfermedad y ningún informe anterior ha explorado la resistencia en las poblaciones de *Colletotrichum* en ñame en Colombia. Por lo tanto, se plantea la siguiente investigación, cuyo objetivo es contribuir en el manejo integrado de la antracnosis del ñame *Colletotrichum* spp., mediante la caracterización de los síntomas de la enfermedad, de su agente causal y la sensibilidad a fungicidas comúnmente empleados en su manejo. La investigación se realizó en dos fases, una en campo y otra en laboratorio; en campo se identificaron y describieron los diferentes síntomas asociados a la antracnosis, luego se obtuvieron los aislados de cada tipo de lesión y se describieron las características macroscópicas y microscópicas de los aislados. La virulencia y severidad de los aislados fue determinada mediante la inoculación *in vitro* de cuatro accesiones promisorias de ñame *D. alata* y tres de *D. rotundata*. La variabilidad genética se determinó secuenciando la región ITS del gen 5,8S. Finalmente, se determinó la sensibilidad de las cepas a los fungicidas mediante ensayos “*in vitro*”. Las observación en campo permitieron clasificar nueve tipos de síntomas en los cultivares de ñame (siete lesiones y dos necrosis). Se obtuvieron 11 aislados monospóricos, que se clasificaron en tres grupos según características morfológicas y culturales, los cuales presentaron diferencias entre su patogenicidad y virulencia en hospederos resistentes y susceptibles. La secuenciación parcial de la región ITS identificaron a *C. gloeosporioides* y *C. fructicola* asociados a la antracnosis del ñame en el departamento de Córdoba. La severidad de la enfermedad mostró diferencias estadísticas, permitiendo clasificar las accesiones como altamente resistente, resistentes y altamente susceptibles. Por último, la sensibilidad de los aislados según los valores de DL₅₀, el azoxystrobin y el difenoconazol fueron más efectivos contra los aislados de *Colletotrichum* spp, probados en este estudio, seguidos por el clorotalonil y el captan, mientras que los fungicidas menos eficaces fueron el mancozeb y el benomyl. Está investigación confirmó la variabilidad en la sintomatología, los rasgos morfológicos, moleculares, la virulencia y la sensibilidad a los fungicidas de las especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis del ñame, las cuales se pueden aprovechar para mejorar las estrategias de manejo de la enfermedad.

Palabras clave: Sensibilidad “*in vitro*” a fungicidas, Morfología de hongos, Patogenicidad, Variabilidad genética.

ABSTRACT

The yam crop is of great importance for the economy of tropical and subtropical countries located in Africa, Asia, Central and South America, and is part of the human diet, being valued for its contribution of carbohydrates and vitamins. The most widely planted species have been affected by phytosanitary problems caused by fungi and viruses, where the most limiting disease is anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), causing losses of up to 85%. Disease management has been done through the application of fungicides and cultural practices without achieving an effective management of the disease; due to the lack of knowledge of the disease and the increasing levels of resistance of the genus to different fungicides, in this sense, the monitoring of resistance to fungicides is crucial to achieve an effective management of the disease and no previous report has explored the resistance in the populations of *Colletotrichum* in yams in Colombia. Therefore, the following research was conducted to evaluate the sensitivity of *Colletotrichum* spp. to fungicides with different modes of action. The research was carried out in two phases, one in the field and the other in the laboratory; in the field, the different symptoms associated with anthracnose were identified and described, then isolates of each type of lesion were obtained and the macroscopic and microscopic characteristics of the isolates were described. The virulence and severity of the isolates was determined by in vitro inoculation of four promising accessions of yam *D. alata* and three of *D. rotundata*. Genetic variability was determined by sequencing the ITS region of the 5,8S gene. Finally, the sensitivity of the strains to fungicides was determined by in vitro assays. Field observations allowed the classification of nine types of symptoms in yam cultivars (seven lesions and two necroses). Eleven monosporic isolates were obtained and classified into three groups according to morphological and cultural characteristics, with a correlation coefficient $r = 0.90$, which showed differences between pathogenicity and virulence in resistant and susceptible hosts. Partial sequencing of the ITS region identified *C. gloeosporioides* and *C. fructicola* associated with yam anthracnose in the department of Córdoba. Disease severity showed statistical differences, allowing the classification of accessions as highly resistant, resistant and highly susceptible. Finally, the sensitivity of the isolates according to LD₅₀ values, azoxystrobin and difenoconazole were most effective against the isolates of *Colletotrichum* spp, tested in this study, followed by chlorothalonil and captan, while the least effective fungicides were mancozeb and benomyl. This research confirmed the variability in symptomatology, morphological and molecular traits, virulence and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. associated with yam anthracnose, which can be exploited to improve disease management strategies.

Keywords: “*In vitro*” fungicide sensitivity, Fungal morphology, Pathogenicity, Genetic variability.

1. INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea* spp.) es un tubérculo comestible de importancia económica en regiones tropicales, siendo un alimento básico de más de 155 millones de personas (Andres *et al.*, 2017). Este se cultiva principalmente en los países tropicales y subtropicales del mundo, incluidos África, Asia, América central y América del sur (FAO, 2020). En Colombia, el cultivo de ñame es una fuente de ingresos y de empleo rural para pequeños y medianos agricultores, existen alrededor de 30.000 familias productoras, el 70% siembra variedades criollas y solo el 16% y el 14% de la producción corresponden a las variedades espinoso y diamante respectivamente (Reina, 2012; MADR, 2020). En comparación con otros alimentos básicos, el ñame proporciona cantidades relativamente mayores de energía y nutrición por unidad de área de suelo y por unidad de tiempo, y es valorado por sus aporte de calcio, fósforo, hierro, carbohidratos y vitaminas como riboflavina, tiamina, vitamina B y vitamina C (González, 2012, Andres *et al.*, 2017). El género *Dioscorea* se ha utilizado en la medicina tradicional africana y asiática para tratar enfermedades como la artritis reumatoide, lesiones traumáticas, bronquitis, enfermedad coronaria, fiebre reumática, además, de mostrar efectos inhibitorios sobre el cáncer (Sun *et al.*, 2017; Siddiqui *et al.*, 2018).

El cultivo de ñame se ve afectado por diferentes problemas que pueden afectar la productividad del cultivo, entre los limitantes se encuentra la antracnosis (*Colletotrichum* spp.), enfermedad que reduce la producción en más del 50% (Abang *et al.*, 2003; Campo, 2011). La enfermedad ha sido limitante en diferentes países productores y en Colombia ha ocasionado pérdidas hasta en un 85% (Campo, 2011). En la Costa Atlántica colombiana, la antracnosis se presenta en forma endémica, afectando principalmente a las variedades criollas de *D. alata*. La enfermedad se caracteriza por presentar diferentes síntomas en campo desde lesiones café oscuras regulares, irregulares, circulares, coalescentes, no coalescentes, con halos cloróticos, produciendo necrosis extensiva de las hojas y muerte regresiva del tallo (Abang *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2003; Ayadole *et al.*, 2006; Abang *et al.*, 2009).

Diferentes estudios han identificado un complejo de especies del género *Colletotrichum*, asociadas a la enfermedad, mediante el uso de rasgos morfológicos, combinados con las técnicas moleculares, se ha descrito y caracterizado la diversidad fenotípica y genética de las diferentes especies, por ejemplo, en Nigeria se identificó a la especie *Colletotrichum gloeosporioides* como agente causal de la antracnosis del ñame (Abang *et al.*, 2001). En India y China se ha reportado *C. fructicola*, *C. capsici* y *C. alatae*, los cuales se presentaron de manera severa, causando grandes pérdidas en el cultivo, lo cual motivó a buscar diferentes estrategias para el manejo de la enfermedad (Han *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018; Jehani *et al.*, 2019). Investigaciones han registrado diferentes especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis del ñame, tales como, *C. truncatum*, *C. dematium*, *C. theobromicola*, *C. alatae*, (Rosado, 2016). En Puerto Rico, mediante la secuenciación parcial de los genes ITS, GAPDH y β -tubulina se caracterizaron las especies *C. gloeosporioides*, *C. ignotum*, *C. tropicale*, *C. aoteora*, *C.*

truncatum, *C. alatae*, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. siamense* y *C. cliviae* (Fuentes, 2015). En Colombia se realizó diagnóstico molecular de *C. gloeosporioides* en ñame, utilizando la técnica molecular “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)”, estos estudios mostraron patrones altamente polimórficos entre los aislados de la colección (Marroquín *et al.*, 2016).

El manejo de la antracnosis involucra el uso de semilla libre del patógeno, la rotación de cultivos, el uso de cultivares resistentes, extracción y quema material infectado y el uso de fungicidas apropiados (Agrios, 2005; Uddin *et al.*, 2018; Islam *et al.*, 2020). A pesar que existen diferentes alternativas para el manejo de la enfermedad, se siguen presentando pérdidas significativas en la producción, principalmente por el desconocimiento que se tiene de la antracnosis, la variabilidad de los síntomas en campo (Ayodele *et al.*, 2006), la alta variabilidad genética de *Colletotrichum* (Weir *et al.*, 2012) y el surgimiento de razas del patógeno resistentes a los fungicidas empleados en el manejo (Han *et al.*, 2018; Arce *et al.*, 2019).

La identificación correcta de los patógenos asociados a la antracnosis del ñame y el conocimiento de la variabilidad de rasgos morfológicos, moleculares y de patogenicidad, resulta de gran importancia para el establecimiento de medidas preventivas y curativas; como la aplicación de fungicidas y el uso de genes de resistencia (Brown, 2006; Campo, 2011), además, el monitoreo de la resistencia a los fungicidas es crucial para lograr un manejo efectivo de la enfermedad por antracnosis y ningún informe anterior ha explorado la resistencia en las poblaciones de *Colletotrichum* en ñame en Colombia. Por estas razones, el objetivo principal de este trabajo fue contribuir en el manejo integrado de la antracnosis del ñame *Colletotrichum* spp., mediante la caracterización de los síntomas de la enfermedad, de su agente causal y la sensibilidad a fungicidas comúnmente empleados en su manejo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de ñame es manejado por pequeños productores, los cuales no tienen la tecnología apropiada ni el capital para el buen manejo del cultivo (Campo *et al.*, 2009). Este sistema productivo presenta diferentes problemas que pueden disminuir los rendimientos en campo; los productores tienen poca disponibilidad de material vegetal de buena calidad fisiológica y sanitaria para la siembra (Pérez *et al.*, 2019), además, existen problemas de baja tecnología; a pesar de la importancia del cultivo, este se lleva a cabo de manera tradicional (Pérez *et al.*, 2015). Sumado a esto, el cultivo es altamente susceptible a patologías devastadoras limitantes de la producción, como la antracnosis, causada por el género *Colletotrichum*, la cual puede afectar el cultivo causando pérdidas en más del 50% (Abang *et al.*, 2003; Cerón *et al.*, 2006; Campo *et al.*, 2009). Además, el género *Colletotrichum* fue nominado como el octavo grupo más importante de hongos fitopatógenos en el mundo (Dean *et al.*, 2012).

La antracnosis es la enfermedad foliar más limitante de los ñames alimenticios, afectando a la mayoría de las especies cultivadas de ñame en los trópicos húmedos y subhúmedos, siendo las especies criollas (*Dioscorea alata*) las más susceptibles a la enfermedad (Winch *et al.*, 1984; Mignucci *et al.*, 1988; Onyeka *et al.*, 2006). Esta enfermedad ha sido considerada de importancia económica en diferentes países productores como Nigeria, Puerto Rico, Islas Salomón, Islas Fiji, Costa de Marfil, India, Estados Unidos y Colombia (Mignucci *et al.*, 1988; Osorio, 1989; Abang *et al.*, 2003). En la Costa Atlántica Colombiana, ha afectado drásticamente la producción llegando a ocasionar pérdidas hasta en un 85% (Campo *et al.*, 2009), causando en la década de los 90's la reducción del área de siembra de 20.100 a 4.547 hectáreas; ocasionando la quiebra de más de 5.000 familias productoras en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar (Negrete y Redondo, 1997).

La enfermedad se manifiesta con diferentes síntomas en campo, lo que ha provocado confusiones en el diagnóstico, tanto en los agricultores como en los profesionales (Abang *et al.*, 2003; Frézal *et al.*, 2012), los cuales asocian cualquier tipo de mancha en el follaje con *Colletotrichum gloeosporioides*, cuando en realidad pueden haber otras especies u otro género fungoso causando la sintomatología; esto puede ser una de las causas del fracaso del manejo de la enfermedad, siendo importante clarificar su etiología. El género *Colletotrichum* se caracteriza por presentar alta diversidad dentro de las especies (Weir *et al.*, 2012; Marroquín *et al.*, 2016; Suwannarat *et al.*, 2017). Trabajos realizados en la Universidad de Córdoba han mostrado la diversidad de este género en su morfología y patogenicidad sobre hospederos susceptibles y resistentes (Jiménez *et al.*, 2009), sin embargo, en estos estudios la identificación y diferenciación de especies estuvo basada en características morfológicas, lo cual a menudo conlleva a diagnósticos inadecuados (Brown *et al.*, 1996; Abang *et al.*, 2001).

El manejo de la enfermedad se basa en la aplicación de fungicidas de síntesis química, no obstante, en Colombia los últimos estudios de evaluación de moléculas para el manejo de antracnosis en ñame fueron realizados a finales de la década de los 80 (Osorio, 1989), por lo que no se cuenta con información actualizada sobre los productos químicos utilizados para el manejo del patógeno.

Investigaciones han reportado que los aislados de *Colletotrichum* en ñame presentan sensibilidad reducida a diferentes fungicidas, en Costa Rica, se evidenció que los fungicidas químicos no inhibieron el 100% del crecimiento micelial de los aislamientos fúngicos asociados a la antracnosis del ñame (Arce et al., 2019). En China se ha reportado la resistencia de Carbendazim en el manejo de la antracnosis causada por el complejo *C. gloeosporioides* en cultivos de ñame y fresa (Han et al., 2018). En Puerto Rico, se encontró que las poblaciones de *C. gloeosporioides* y *C. alatae* causantes de antracnosis en ñame, son resistentes Azoxystrobin (Rosado, 2016).

Los estudios de sensibilidad diferencial de fungicidas de síntesis química, sobre los aislamientos de *Colletotrichum* spp, en el cultivo de ñame, son una señal de que la efectividad de algunos de estos productos químicos, se ha venido reduciendo gradualmente como resultado de la aparición de resistencia en las poblaciones del patógeno, debido a la alta presión de selección ejercida por el uso continuo de dichas moléculas, la alta variabilidad genética del hongo, los diferentes mecanismos de resistencia del género *Colletotrichum* y el desconocimiento en los niveles de sensibilidad a las diferentes fungicidas químicos usados para el manejo de la enfermedad. Esta problemática da como resultado el surgimiento de rasas del patógeno resistentes a los fungicidas, bajo rendimiento y productividad del cultivo, problemas medioambientales, el aumento de los costos de producción y el abandono del cultivo. No obstante, en Colombia no está claro si las poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas a la antracnosis del ñame presentan sensibilidad reducida a los fungicidas, debido a que no existen reportes de la exploración de la resistencia en aislamientos del patógeno a los diferentes grupos químicos de los fungicidas más usados para el manejo de las enfermedades de las plantas, siendo la resistencia química en hongos un problema serio a resolver en la producción agrícola.

Teniendo en cuenta que la resistencia a los fungicidas es un problema que pone en riesgo la producción de los cultivos y la seguridad alimentaria, se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Cuáles son los niveles de sensibilidad de aislados de *Colletotrichum* de ñame a los fungicidas comúnmente empleados en Colombia para el manejo de la antracnosis del ñame?

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Contribuir en el manejo integrado de la antracnosis del ñame *Colletotrichum spp.*, mediante la caracterización de los síntomas de la enfermedad, de su agente causal y la sensibilidad a fungicidas comúnmente empleados en su manejo

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar los diferentes síntomas de la antracnosis del ñame, con la morfología de los diferentes aislados de *Colletotrichum spp.*, asociados con la enfermedad
- Determinar la variabilidad genética de aislados de *Colletotrichum spp.* asociados con la antracnosis del ñame, mediante la secuenciación parcial de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS)
- Determinar la sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Colletotrichum spp.* en ñame a fungicidas de síntesis química

4. MARCO TEÓRICO

4.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE ÑAME

El ñame (*Dioscorea* spp.) es un tubérculo comestible de gran importancia económica en regiones tropicales, siendo consumido por 155 millones de personas (Sangakkara y Frossard, 2014; Andres *et al.*, 2017). Anteriormente, se consideraba un cultivo de subsistencia, sin embargo, desde los años noventa ha adquirido un papel importante en la economía global (González, 2012; Sun *et al.*, 2017), debido al aumento de su consumo y a que se ha extendido su uso en la industria farmacéutica, ya que la diosgenina que se extrae de sus tejidos, es un precursor en la síntesis de hormonas (Siddiqui *et al.*, 2018; Wumbei *et al.*, 2019).

Tabla 1. Producción, Área y rendimiento del cultivo de ñame a nivel mundial (FAO, 2020).

País	Producción (t)	Área (ha)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
Nigeria	50.052.977	6.307.232	79.358
Ghana	8.532.731	468.433	182.155
Costa de marfil	7.654.617	1.200.405	121.251
Benín	3.150.248	228.998	137.567
Togo	868.677	98.547	88.148
Camerún	707.576	62.008	114.110
República Centroafricana	491.960	58.533	84.048
Chad	458.054	47.784	95.859
Colombia	423.827	34.508	122.820
Papua Nueva Guinea	364.387	21.185	172.002
Guinea	268.875	21.284	126.327
Brasil	250.268	25.428	98.422
Gabón	217.549	35.485	61.307
Japón	174.012	7.452	233.510

Las especies de *Dioscorea* más comercializadas en el mundo son *D. rotundata* y *D. alata*, siendo esta última la más cultivada (Abang *et al.*, 2003; Frossard *et al.*, 2017). El área cosechada a nivel mundial indica que Nigeria es el país como mayor área sembrada, con 6.307.232 ha, seguidos por Costa de Marfil y Ghana, con 1.200.405 ha y 468.433 ha, respectivamente, mientras que Colombia sembró aproximadamente 34.508 ha ubicándose en el escalafón número 11 a nivel mundial (Tabla 1).

En cuanto a la producción mundial, esta se referencia en 56 países, con una producción de 74.321.794 t, donde el 90% es producida en los países de Nigeria con 50.052.977 t, Ghana con 8.532.731 t, Costa de Marfil con 7.65.4617 t y Benín con 3.150.248 t, mientras que Colombia se encuentra en el puesto número nueve, con una producción de 423.827 t (FAO, 2020). El promedio del rendimiento a nivel mundial se encuentra en 8,6 t.ha⁻¹, siendo la Guyana y Japón los que presentaron mejores rendimientos con 68,2 y 23,3 t.ha⁻¹, respectivamente. Colombia se encuentra por encima de la media, con un rendimiento promedio de 12,2 t.ha⁻¹ y ocupa el puesto 15 del ranking mundial (FAO, 2020).

En Colombia, el ñame se usa para alimentación de la población de la Costa Caribe; es cultivado por pequeños y medianos agricultores y constituye la principal fuente de ingresos y de empleo rural. Es un cultivo de bajo nivel tecnológico, sembrado generalmente en asocio con otras especies de pan coger (CORPORACION PBA, 2009). Los excedentes de la producción son exportados, en el primer semestre de 2019 generó US \$6,02 millones con una participación del 42,54% sobre el valor total de las exportaciones de hortalizas, plantas, raíces y tubérculos alimenticios (ANALDEX, 2019). En la tabla 2, se evidencia que el departamento de Córdoba participó con 11.080 ha sembradas, lo cual representa el 40,89% del área nacional, seguida por Bolívar con 10.110 ha (37,73%) y Sucre con 2.211 ha (8,16%). En cuanto a producción, Córdoba fue el departamento de mayor producción con 132.677 t, en segundo lugar Bolívar con 125.330 t y Sucre con 18.571 t. Con respecto al rendimiento, Bolívar produjo 12,40 t.ha⁻¹, Córdoba 11,97 t.ha⁻¹ y Sucre 8,40 t.ha⁻¹ (Agronet, 2018).

En el Caribe Colombiano, el cultivo de ñame presenta rendimientos aproximados de 11,6 t.ha⁻¹, sin embargo, en lugares con niveles de lluvia y suelos adecuados, un cultivo bien manejado debe ser capaz de lograr un rendimiento promedio de 25 t.ha⁻¹ (Luna *et al.*, 2018). Por tanto, la brecha de productividad promedio de las plantaciones en Colombia es de 13,4 t.ha⁻¹, con un valor aproximado de \$14.150.400 COP, conforme al precio promedio nacional del ñame que se registró en \$1.056 COP por kilo en el año 2021 (MADR, 2021). Además de esto, existen brechas en el rendimiento del cultivo entre los diferentes departamentos de Colombia. Por ejemplo, el departamento del Atlántico presenta el mejor rendimiento (16,36 t.ha⁻¹) y presenta brechas de 15,36 t.ha⁻¹ con Nariño, 12,67 t.ha⁻¹ con Casanare, 11,37 t.ha⁻¹ con Caquetá y presenta brechas más reducidas con los departamentos de Bolívar, Córdoba y Sucre. La baja competitividad de este sistema productivo, se puede deber a que el cultivo de ñame, es producido en forma tradicional con escasa adopción de tecnología y prácticas de manejo, además los productores no cuentan con semilla de buena calidad para la siembra (Pérez *et al.*, 2019), emplean bajas densidades de población, no usan tutores adecuados durante el ciclo fenológico del cultivo (Luna *et al.*, 2018; Tamara *et al.*, 2021) y hay presencia de enfermedades devastadoras como la antracnosis (*Colletotrichum* spp.) (Campo y Royet, 2020).

Tabla 2. Área, producción y rendimiento del cultivo de ñame en Colombia por departamento (Agronet, 2018).

Departamento	Área (ha ⁻¹)	Producción (t ⁻¹)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
CORDOBA	11.080	132.677	11,97
BOLIVAR	10.110	125.330	12,40
SUCRE	2.211	18.572	8,40
ANTIOQUIA	1.085	14.451	13,32
CHOCO	1.021	7.812	7,65
LA GUAJIRA	493	5.980	12,13
CESAR	465	4.604	9,90
MAGDALENA	400	3.074	7,68
ATLANTICO	167	2.733	16,37
NARIÑO	19	19	1,00
CAQUETA	15	75	5,00
CASANARE	10	37	3,70
CUNDINAMARCA	10	50	5,00
VAUPES	7	18	2,50
SAN ANDRES Y PROVIDENCIA	1	2	3,53

4.2. LIMITANTES DEL CULTIVO

El cultivo de ñame presenta diferentes problemas que pueden causar pérdidas en su producción, por ejemplo, se conoce que el desarrollo extensivo de este sistema productivo se ha visto limitado por la poca disponibilidad de material vegetal de plantación con adecuada calidad fisiológica y sanitaria, es frecuente que los productores escojan el material para semilla a partir de la cosecha, el cual en ocasiones no reúne las condiciones óptimas de calidad para este fin (Pérez *et al.*, 2019). Además, existen problemas de baja tecnología; a pesar de la importancia del cultivo, este se lleva a cabo de manera tradicional, existe desconocimiento de las principales labores culturales y de manejo del cultivo, en especial de la destinada a la exportación (Pérez *et al.*, 2015). Esto ha ocasionado que se encuentran bajos rendimientos, la producción de tubérculos deformes y de gran tamaño que son rechazados por el mercado internacional, ocasionando grandes pérdidas al pequeño productor (Pérez y Campo, 2016). Sumado a esto, el cultivo se ve afectado por diferentes enfermedades que disminuyen la producción, siendo frecuente la presencia de manchas en el follaje y la muerte de las plantas ocasionada por los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia pallescens*, *Curvularia eragrostides*, *Pestalotia* sp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* y virus (mosaico del ñame – YMV) (Amusa *et al.*, 2003; Egesi *et al.*, 2007).

Otro limitante de la producción, es la pérdida en post-cosecha, durante el almacenamiento, por causa de la pudrición seca (asociada a *Lasiodiplodia theobromae*, *Aspergillus tamari*, *Penicillium oxalicum*, *P. cyclopium*, *P. italicum*, *Fusarium oxysporium* y *F. solani*). La Pudrición blanda (asociada a *Rhizopus nigricans*, *Sclerotium rolfsii*, *Muccor circinelloides* y *Trichoderma viridae*). Pudrición húmeda (*Erwinia carotovora*) (Amusa *et al.*, 2003; Rosado, 2016). De los patógenos mencionados, el género *Colletotrichum*, agente causal de la antracnosis, es el más limitante en la producción de ñame, el cual puede causar pérdidas superiores al 80% si no se establecen estrategias de manejo adecuadas (Amusa *et al.*, 2003; Abang, 2003; Campo, 2009).

4.3. LA ANTRACNOSIS

La antracnosis, que significan ennegrecimiento, afecta el follaje, tallos, flores o frutos; generalmente aparecen como manchas de color oscuro o lesiones hundidas con un borde ligeramente elevado; puede ser causada por especies de *Colletotrichum* o su teleomorfo *Glomerella*, afectando numerosos cultivos y plantas ornamentales, ocasionando pérdidas significativas en los trópicos y subtropicales, en cultivos de importancia económica como el aguacate, el café, el plátano, el mango, la papaya y el ñame entre otros (Agrios, 2005). En la Costa Atlántica colombiana, la antracnosis del ñame se presenta en forma endémica, afectando principalmente a las variedades criollas de *D. alata*, reduciendo los rendimientos en más del 50% si no se establecen medidas eficaces de manejo (Campo y Luna, 1988). Esta es llamada por los agricultores como mancha de hierro o quemazón, presentándose en 1989 en forma epidémica en el genotipo criollo "concha de coco", arrasando más del 80% de las áreas sembradas (Negrete y Redondo, 1997).

4.3.1. Etiología de la antracnosis

La antracnosis del ñame es causada por un complejo de especies del género *Colletotrichum*, donde se han reportado una gran variedad de especies que interactúan en este patosistema, entre las cuales se han descrito *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *C. alatae*, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. truncatum* (Abang, 2003; Castro *et al.*, 2003, Jiménez *et al.*, 2009; Fuentes, 2015, Rosado, 2016; Han *et al.*, 2018). Estas fueron clasificadas taxonómicamente según el Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI, 2013) dentro de: Dominio: Eukaryota, Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Clase: Sordariomycetes, Orden: Glomerellales, Familia: Glomerellaceae, Género: *Glomerella* (anamorfo: *Colletotrichum*).

Trabajos realizados en Colombia se han basado en características morfológicas para identificar la especie asociadas a la antracnosis del ñame (Castro *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2009), teniendo en cuenta que esto puede llevar a cometer errores durante el diagnóstico, este trabajo busca combinar técnicas clásicas de diagnóstico, basadas en los rasgos morfológicos y las técnicas moleculares que ayudan a tener una identificación correcta de la especie de *Colletotrichum* spp. Por otro lado, el gran número de especies y razas fisiológicas de *Colletotrichum* que se han reportado afectando el cultivo de ñame, hace pensar que es una de las causas de las deficiencias en el manejo de la enfermedad, debido a la escasez de investigaciones enfocadas en el manejo químico y que algunos productos solo se han probado sobre un número limitado de aislados.

4.3.2. Biología de *Colletotrichum* spp.

El ciclo de vida de las especies de *Colletotrichum* incluye etapas reproductivas tanto sexual (teleomorfo) como asexual (anamorfo) (Figura 1). Estas etapas pueden ocurrir en la planta hospedero o en los restos de la planta (Damm *et al.*, 2012; Barcelos *et al.*, 2014). La reproducción sexual puede ocurrir al final de las epidemias, en hojas o tallos muertos que, cuando se dejan en la superficie del suelo, pueden contribuir a la infección primaria del ñame (Ripoche *et al.*, 2007). Las condiciones ambientales favorables para la formación de peritecios inducen la liberación de ascosporas que infectan los tejidos vegetales vecinos; luego el tejido vegetal infectado desarrolla acérvulos, que produce masas de conidios en conidióforos, los cuales se diseminan por salpicaduras de lluvia o viento a plantas sanas (Green y Simons, 1994; Penet *et al.*, 2014).

Para invadir las células epidérmicas del hospedero, las esporas del hongo germinan, forman un germen corto y un apresorio que a medida que madura, se incluye una capa de melanina en la pared celular del apresorio (Deising *et al.*, 2000; Münch *et al.*, 2007). Luego de la penetración en la célula hospedero, la mayoría de las especies de *Colletotrichum* establecen una interacción biotrófica temprana seguida de un cambio a un estilo de vida necrotrófico (Mendgen y Hahn, 2002), y por tanto se les conoce como hemibiotróficos. En esta etapa, las células hospedero permanecen vivas y las plantas no muestran ningún síntoma. Entre 48 y 72 h después de la inoculación, dependiendo de las condiciones ambientales, las hifas de infección de las especies de *Colletotrichum* se convierten en su fase necrotrófica y secretan enzimas degradantes de la pared celular que matan las células hospedero y aparecen los síntomas (Barimani *et al.*, 2013). La transición del estilo de vida implica una reprogramación dinámica de varias capas, que incluye la expresión de una amplia gama de genes que codifican enzimas líticas, así como la biosíntesis de toxinas que acompaña el crecimiento rápido, la colonización sistémica y la descomposición de las células hospedero (Tugizimana *et al.*, 2019).

Este patógeno genera infecciones quiescentes en el tubérculo de ñame (Green y Simons, 1994), facilitando la dispersión en la semilla de una temporada de cultivo a la siguiente (Green y Simons, 1994; Neema y Frezal, 2018). Se ha demostrado que muchas especies de *Colletotrichum* existen como endófitos durante parte o la mayoría de sus ciclos de vida en muchos grupos de plantas (Manamgoda *et al.*, 2013; Mercado *et al.*, 2019). Los complejos ciclos de vida de muchas especies de *Colletotrichum*, su potencial para infectar de manera cruzada una amplia gama de especies hospedadoras y cambiar su estilo de vida crean grandes dificultades para controlar las enfermedades que causan (De Silva *et al.*, 2017).

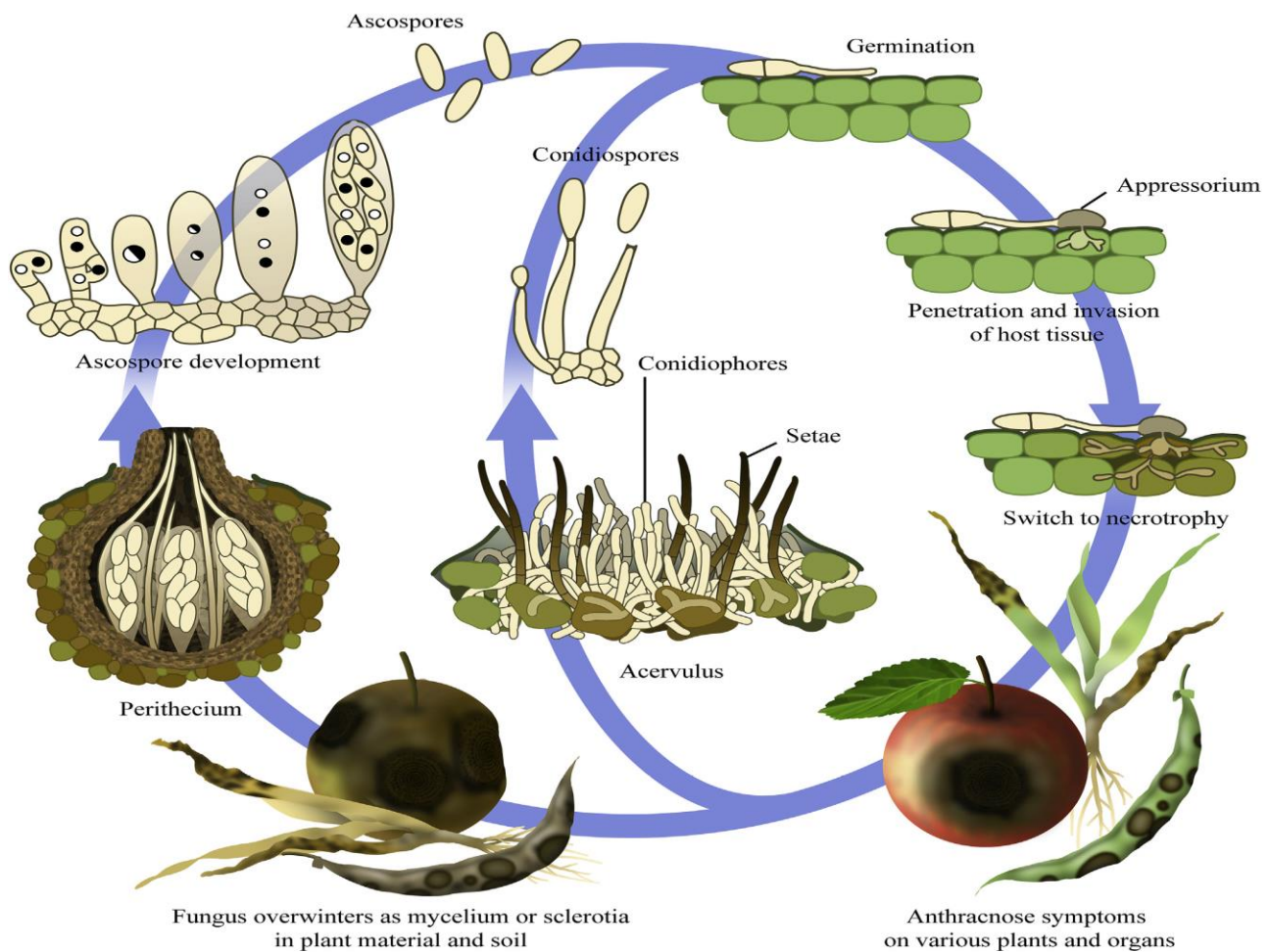


Figura 1. Ciclo de vida de especies de *Colletotrichum* (De Silva *et al.*, 2017)

4.3.3. Síntomas de la antracnosis en ñame

Las investigaciones realizadas en la antracnosis del ñame, han reportado diferentes tipos de síntomas, entre los cuales se mencionan en el follaje, lesiones café oscuras regulares, irregulares, circulares, coalescentes, no coalescentes, con halos cloróticos, produciendo necrosis extensiva de las hojas y muerte regresiva del tallo (Abang *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2009).

Además, Ayodele *et al* (2006), reportaron que en campo se presentan siete tipos de manchas y cuatro tipos de tizones, los cuales se describen como:

- Mancha tipo 1: punto regular con halo amarillo
- Mancha tipo 2: punto marrón largo irregular con halo amarillo
- Mancha tipo 3: punto marrón largo con anillos concéntricos y centro gris
- Mancha tipo 4: punto marrón claro rodeado por un anillo marrón oscuro
- Mancha tipo 5: puntos dispersos en la lámina foliar rodeados de halos amarillos.
- Mancha tipo 6: puntos grises con borde marrón oscuro que se fusionan para formar lesiones y causar la deformación del borde de la lámina foliar.
- Mancha tipo 7: puntos marrón con centro marrón oscuro
- Tizón tipo 1: lesión marrón larga en el nervio central, rodeada por una mancha larga amarilla
- Tizón tipo 2: lesión larga marrón en el margen de la lámina rodeada por una mancha amarilla
- Tizón tipo 3: lesión larga gris rodeada por una mancha verde oliva en el ápice de la hoja que se extiende hacia adentro.
- Tizón tipo 4: lesión larga gris rodeada por una mancha verde oliva que inicia del borde de la lámina y se extiende hacia adentro.



Figura 2. Síntomas de la antracnosis en el cultivo de ñame (Ayodele *et al.*, 2006)

Evaluaciones realizadas a nivel de laboratorio y bajo condiciones controladas han mostrado dos síntomas diferentes al inocular hojas de ñame con diferentes aislados de *Colletotrichum* spp., i) la lesión típica que es una necrosis grande, marrón oscuro, coalescente, alta tasa de expansión y ii) la lesión puntual, que consta de pequeños puntos de menos de 2 mm de diámetro, negros, no coalescente (Winch *et al.*, 1984; Castro *et al.*, 2003; Frézal *et al.*, 2012). Debido a las condiciones agroclimáticas variables, los síntomas de la enfermedad también pueden variar entre la región, el hospedero y ambiente (Kumar, 2014). Por tanto, los diferentes tipos de síntomas deben medirse por separado para estimar con precisión la agresividad del patógeno, además necesitan ser aclarados y definidos para poblaciones particulares, con el fin de evitar confusiones y aportar a la unificación de nombres empleados para describirlos (Abang *et al.*, 2003; Frézal *et al.*, 2012; Pinzón, 2014).

4.3.4. Caracterización e identificación del genero *Colletotrichum*

Los estudios taxonómicos y filogenéticos sobre el género *Colletotrichum*, causante de la antracnosis del ñame, lo identifican como *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.; sin embargo, la taxonomía e identificación de muchos fitopatógenos se viene realizando mediante técnicas moleculares (Weir *et al.*, 2012); ya que muchas de estas se realizaron mediante características morfológicas (Beltrán, 2000; Santacruz, 2013).

Trabajos realizados en la Universidad de Córdoba mostraron la diversidad de *Colletotrichum gloeosporioides* y la presencia de *C. dematium* presentes en el cultivo de ñame con diversos grados de virulencia (Jiménez *et al.*, 2009); siendo esta una característica de la presencia de diferentes razas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Abang *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2003).

Las técnicas moleculares han ayudado en la identificación correcta de las especies de *Colletotrichum* spp. que afectan el cultivo de ñame (Beltrán, 2000); estas implican el uso de marcadores basados en hibridación del ADN, tales como polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) (Abang *et al.*, 2002), métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) (Aduramigba *et al.*, 2012), Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) (Mignouna *et al.*, 2002) y la secuenciación del ADN ribosomal (rADN) que comprende tres genes conservados, el gen de la subunidad grande, el gen de la subunidad pequeña y el gen 5.8S, intercalados con una región espaciadora variable llamada Espaciador Interno Transcrito (ITS), la cual se repite muchas veces en el genoma nuclear (Fox y Naraa, 2006). Otros genes utilizados para la caracterización de especies de *Colletotrichum*, han sido los genes que codifican para las proteínas Beta-tubulina y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Liu *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2018; dos Santos *et al.*, 2020).

En Colombia se realizó diagnóstico molecular diferencial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame por secuenciación de los ITS del ADNr, esto permitió seleccionar la amplificación del factor de elongación alpha (EF- α) como la mejor prueba de diagnosis (Pinzón *et al.*, 2013). Otros autores como Marroquín *et al.* (2016) caracterizaron molecularmente 42 aislamientos de *Colletotrichum* procedentes de plantas de ñame, utilizando la técnica molecular “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)”. Para la determinación de polimorfismos, se amplificaron 16 marcadores DAF implementando iniciadores tipo decámero, la amplificación arrojó 391 bandas inequívocamente polimórficas en todas las muestras, el coeficiente de Dice, identificó cinco grupos con 0.30% de similaridad y el índice de diversidad genética fue de 0.28; datos que reflejan un alto grado de variabilidad en la colección estudiada de *C. gloeosporioides*. Por último, se encontró que DAF es una técnica reproducible, confirmando que es una metodología fiable para la caracterización molecular de hongos. Para la identificación del genero *Colletotrichum* en guanábana (Álvarez *et al.*, 2005) amplificó DNAr con el cebador ITS4 y el cebador CgInt (específico para la especie *C.*

gloeosporioides), lo cual produjo un fragmento de 450 pb en el 89,3% de los aislamientos evaluados correspondiendo con la especie *C. gloeosporioides* y el 8.9% a la especie *C. acutatum*, utilizando los cebadores ITS 4 y Calnt2, los cuales generaron un fragmento de 490 pb, de un total de 56 aislamientos evaluados. De igual manera, estos mismos cebadores han sido empleados para la diferenciación entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* en cultivos de Tamarindo, Ají y Mango en Colombia (Afanador *et al.*, 2003; Santacruz, 2013; Mercado *et al.*, 2019).

La identificación correcta de los patógenos asociados a la antracnosis del ñame y el conocimiento de la variabilidad de rasgos morfológicos, moleculares y de patogenicidad, resulta de gran importancia para el establecimiento de medidas preventivas y curativas; como la aplicación de fungicidas.

4.3.5. Manejo de la antracnosis

El manejo de la enfermedad, depende del uso de semilla libre del patógeno, la rotación de cultivos, el uso de cultivares resistentes, extracción y quema material infectado y, por último, la utilización de fungicidas apropiados (Agrios, 2005; Islam *et al.*, 2020). Se han realizado trabajos encaminados al manejo de la enfermedad a través de métodos químicos y de resistencia genética; sin embargo, los agricultores prefieren usar genotipos con resistencia a la enfermedad. En Córdoba se realizaron siembras intercaladas con dos genotipos de *D. alata* variedad Concha de coco, susceptible a la antracnosis con la variedad Diamantes 22, resistente a la antracnosis consiguiendo reducir la severidad en el genotipo susceptible en 29% e incrementando los rendimientos en 554 kg en relación a la siembra en monocultivo (Campo y Luna, 1998).

En Nigeria se ha evaluado la resistencia del banco de germoplasma de ñame a la antracnosis, bajo condiciones de campo en lotes en donde la enfermedad se manifiesta en forma endémica, teniendo como resultado varios genotipos con resistencia a la enfermedad (Nwadike *et al.*, 2017). Trabajos similares se adelantan en Colombia por parte de AGROSAVIA y la Universidad de Córdoba, quienes vienen evaluando anualmente la resistencia del banco de germoplasma a la antracnosis (Campo, 2011). Otras alternativas de manejo, como el uso de microorganismos antagonistas, se han evaluado como métodos de control *in vitro* y bajo condiciones de campo, donde los géneros *Trichoderma* y *Streptomyces* presentaron un alto potencial para el control de la antracnosis del ñame (Soares *et al.*, 2006; Palaniyandi *et al.*, 2011; Gwa y Ekefa, 2017).

3.5.1. Sensibilidad de *Colletotrichum* spp. a fungicidas

En la región caribe colombiana existen pocos estudios sobre el uso de fungicidas para el control de la antracnosis en ñame y se ha reportado que los bencimidazoles son los más eficaces en el manejo (Osorio, 1989). No obstante, estas investigaciones son demasiado antiguas, requiriendo evaluarse la sensibilidad con las nuevas poblaciones de *Colletotrichum*.

Investigaciones realizadas por Arce *et al.* (2019) en Costa Rica indicaron que las concentraciones de fungicidas químicos utilizadas sobre los aislamientos fúngicos de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum truncatum* y *Mycoleptodiscus* sp. asociados a la antracnosis del ñame, no alcanzaron a el 100 % de inhibición micelial; y productos como el Carbendazin, Propiconazol y Propineb fueron los de mayor efectividad; mientras que, la Azoxistrobina no fue eficaz a ninguna concentración sobre ningún aislamiento. Rosado (2016), mediante ensayos colorimétricos *in vitro*, mostraron que los fungicidas Fludioxonil, Ciprodinil, Penthiopyrad, Clorotalonil inhibieron el crecimiento micelial de aislados de *C. gloeosporioides* y *C. alatae* causantes de antracnosis en ñame, además se evidenció resistencia a Azoxystrobin. En China se ha reportado la resistencia de Carbendazim en el manejo de la antracnosis causada por el complejo *C. gloeosporioides* en cultivos de ñame y fresa (Han *et al.*, 2018).

Estos trabajos indican que el género *Colletotrichum* ha mostrado la tendencia a presentar resistencia a los fungicidas usados para el manejo de la antracnosis en ñame, debido a que posee una extraordinaria capacidad de adaptación y variabilidad genética elevada (Weir *et al.*, 2012; Suwannarat *et al.*, 2017). Esto no ha sido reportado en Colombia, por lo que buscamos determinar si existe resistencia a los fungicidas en las poblaciones de *Colletotrichum* y hacer recomendaciones de las moléculas más eficaces.

5. METODOLOGÍA

5.1. LOCALIZACIÓN

La investigación se realizó en dos fases, una parte de campo y otra en laboratorio. En la fase de campo se tomaron muestras con síntomas de la enfermedad en plantas del banco de germoplasma de ñame (*Dioscorea* spp.) de la Universidad de Córdoba. Luego, las muestras fueron analizadas en el laboratorio de fitopatología de la Universidad de Córdoba. Localizado en el municipio de Montería, Departamento de Córdoba a 14 msnm, con temperatura promedio de 28°C, humedad relativa de 80% y precipitación de 1200 mm año (IDEAM, 2020).

5.2. PROCEDIMIENTO

Objetivo 1. Relacionar los diferentes síntomas de la antracnosis del ñame, con la morfología de los diferentes aislados de *Colletotrichum* spp., asociados con la enfermedad

a) Descripción de síntomas de antracnosis en ñame

Mediante observaciones en el follaje, se identificaron y describieron los diferentes síntomas asociados a la antracnosis del ñame en las variedades criollos (*D. alata*) y espino (*D. rotundata*) cultivadas en el banco de germoplasma de la universidad de Córdoba. Teniendo en cuenta la forma, el tamaño, color, presencia de halo y ubicación de la lesión en la hoja; igualmente se describieron los diferentes tipos de necrosamiento (Ayodele et. al., 2006).

b) Obtención de aislamientos monospóricos de *Colletotrichum* spp

Se realizó el aislamiento de cada tipo de lesión descrita, con cada muestra se hicieron cámaras húmedas que se incubaron a 28°C durante 24 horas, tiempo después se observaron a través del estereoscopio y con la ayuda de una aza de aguja se tomó la masa de conidias de los acérvulos esporulados, estas fueron desprendidas sobre el medio de cultivo Papa- Dextrosa- Agar (PDA) con la ayuda de una pipeta que contenía agua destilada estéril, de la cual se vertieron de 4 a 6 gotas en el aza suspendido sobre el medio. Las conidias se esparcieron con la ayuda de una aza de drigalsky sobre las cajas con el medio de cultivo, las cuales se incubaron a 28°C durante 24 horas.

Posteriormente, se hicieron observaciones en el microscopio y las conidias germinadas fueron transferidas individualmente a cajas de Petri con medio Papa-Dextrosa-agar (PDA), luego se incubaron durante 8 días a 28°C (Castellanos *et al.*, 2011). La identificación del género *Colletotrichum* spp. se realizó mediante observaciones microscópicas de las estructuras reproductivas del hongo y fueron comparadas con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998). Los aislados fueron conservados por el método de crioconservación y cultivo periódico en aceite mineral (Pinzón *et al.* 2009).

c) Características macroscópicas de la colonia

De cada uno de los aislados purificados, se describieron las características macroscópicas de la colonia: color (superior y reverso), textura (aterciopeladas, pulverulentas, granular, algodonosas), tipo crecimiento (plano, elevado, dobles), esporulación (escasa, abundante), producción de fase ascogena (presente o ausente), diámetro de la colonia en cm a las 24, 48, 72, 96, 120 horas y tasa de crecimiento de la colonia (Jiménez *et. al.*, 2009).

d) Características microscópicas de la colonia

Para la evaluación de los rasgos microscópicos se tomaron 50 conidias elegidas al azar y se describió su forma, teniendo en cuenta tres categorías: 1) cilíndrica, con ambos extremos redondeados. 2) cilíndrica intermedia, con un extremo en ángulo agudo y el otro redondo. 3) fusiforme, ambos extremos con ángulo agudo (Smith y Black, 1990). El tamaño de las conidias de cada aislado se determinó utilizando microscopía de luz; para las mediciones se utilizó un micrómetro adaptado al ocular y calibrado para el objetivo 40X. De los acérvulos se determinó el tamaño, color y setas (largas, cortas, inconspicuas). Con los datos obtenidos de las variables morfológicas se realizó una matriz de similaridad y distancia con el coeficiente de Gower en el programa estadístico R-Studio v.4.1.2. Los resultados fueron presentados con un dendrograma para observar los grupos formados mediante el método de Ward (Jiménez *et. al.*, 2009; Pinzón, 2014).

e) Patogenicidad de los aislados

La habilidad de las cepas para reproducir los síntomas en ñame, fue evaluada inoculando siete accesiones promisorios que se vienen evaluando en la Universidad de Córdoba, Montería, Colombia, desde hace más de 15 años, las cuales fueron seleccionadas por agricultores, por las características morfológicas del tubérculo para su comercialización (Campo *et al.*, 2009). Los materiales probados estuvieron distribuidos de la siguiente forma: cuatro materiales de ñame criollo (*Dioscórrea alata*): 020; 063, las cuales son consideradas como resistentes a la antracnosis, las accesiones 045; 047

consideradas de alta susceptibilidad a la enfermedad y tres materiales de ñame espinoso (*Dioscorea rotundata*): 088; 157 y 167 resistentes a la enfermedad. Se cosecharon hojas jóvenes completamente expandidas en plantas de tres meses de edad, las cuales no debían presentar síntomas de antracnosis, luego se lavaron y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto. Las hojas fueron inoculadas depositando dos discos de agar de 0,5 cm de cada uno de los aislamientos fúngicos crecidos durante 8 días en PDA. Luego se colocaron en cámara húmeda, las cuales constaron de una bolsa plástica, hermética y transparente, de 20 x 25 cm, que contenía un papel filtro estéril y humedecido con agua destilada estéril, las hojas inoculadas se incubaron a 28°C con 24 horas de luz durante ocho días (Jiménez et. al., 2009). El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial AxB: 11 aislados (A) y 7 accesiones (B), con tres repeticiones, considerándose una hoja como unidad experimental, como testigo se tomaron tres hojas de cada accesión sin inoculación. En el ensayo se evaluaron tres condiciones: 1) la habilidad de las cepas para reproducir los síntomas descritos, 2) la virulencia de los aislados, teniendo el rango de hospederos, es decir, el número de accesiones que pueden afectar y 3) la resistencia de cada accesión; esta se midió siguiendo la metodología propuesta por Nwadike *et al* (2017), donde se determinó la severidad de la antracnosis a los 8 días después de la inoculación, según la proporción del área foliar afectada en el punto de inoculación, utilizando una escala de clasificación (tabla 3). Los datos de severidad fueron analizados con estadística no paramétrica utilizando el paquete ARTool (Kay *et al.*, 2021) en el programa R-Studio v. 4.1.2 y se estimaron las diferencias entre los tratamientos mediante una prueba de comparación múltiple de Duncan al 5%.

Tabla 3. Escala de severidad para evaluar el porcentaje de severidad y determinar el grado de resistencia del genotipo (Nwadike *et al.*, 2017).

GRADO	ÁREA AFECTADA (%)	GRADO RESISTENCIA
1	0 - 5	Altamente resistente (AR)
2	5 -10	Resistente (R)
3	10 – 25	Moderadamente resistente (MR)
4	25 – 50	Susceptible (S)
5	>50	Altamente susceptible (AS)

Objetivo 2. Determinar la variabilidad genética de aislados de *Colletotrichum* spp. asociados con la antracnosis del ñame, mediante la secuenciación parcial de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS).

a) Extracción de ADN

Partiendo de los diferentes aislados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cultivos monospóricos crecidos en PDA durante 8 días a 28 °C. Se tomó el micelio de cada muestra y se maceraron en un mortero estéril con nitrógeno líquido, esto con el fin de romper la pared y membrana celular del hongo, luego se agregaron 540 µL de Buffer bromuro de hexadeciltrimetilamonio 2X (CTAB) y se depositó la solución en un tubo de 1,5 mL, enseguida se le agregaron 60 µL de Polyvinylpyrrolidone (PVP) al 10%. Luego se calentó la mezcla en baño de María durante 60 minutos a 65°C y se agitó en vortex cada 15 minutos. Posteriormente fueron retirados del baño de María y se dejaron reposar por 5 minutos. Luego se agregaron 900 µL de solución de cloroformo-álcool isoamílico 24:1 y se agitó por inversión durante 5 minutos. Las muestras fueron llevadas a la centrifuga a 7500 gravedades durante 5 minutos, el sobrenadante fue traspasado a un nuevo tubo de reacción de 1,5 µL que contenía 600 µL de isopropanol y se mezcló por inversión, la anterior mezcla fue incubada a -20°C durante 10 minutos y centrifugó por 3 minutos a 13000 r.p.m.. El sobrenadante fue descartado y se agregaron 600 µL de etanol al 70%, después se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 minutos, invirtiéndolos abiertos sobre papel filtro. Finalmente, el ADN fue suspendido en 100 µL de solución de rehidratación y se calentó a 65°C por 60 minutos en baño de María. Para confirmar la integridad del ADN se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1% (Pinzón *et al* 2013; Pinzón, 2014; Marroquín *et al*, 2016).

b) Amplificación y secuenciación de Espaciadores Internos Transcriptos (ITS)

Para la amplificación de los ITS se usaron los cebadores universales ITS3 e ITS4, los cuales flanquean la región que comprende los espaciadores 1, 2 y el gen ribosomal 5.8S (Tabla 4). Las reacciones de PCR se realizaron para un volumen final de 50 µL, los cuales contenían 25 µL del kit DreamTaq Hot Start PCR Master Mix 2X (Promega), 1 µL del primer forward (ITS3), 1 µL del primer reverse (ITS4), 5 µL de ADN y 18 µL de agua Milli-Q. El programa de termociclaje (C100™ de BIO-RAD) correspondió con un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, 34 ciclos de amplificación (desnaturalización por 20 segundos a 95°C, anillamiento por 10 segundos a 51,7°C y extensión por 1 minuto a 72°C) y un ciclo de extensión por 5 minutos a 72°C. Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, teñidos con EZ – Vision, durante 60 minutos a 85 voltios y fueron enviados para su secuenciación.

c) Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron comparadas para identificación por similitud contra bases de datos internacionales con la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias fueron editadas con el programa Jalview versión 2.11.1.0 y se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con la aplicación ClustalWS, el cual se usó para construir árboles filogenéticos, se construyó un filograma con el criterio de máxima parsimonia (MP). La estabilidad del clado se evaluó mediante análisis de arranque (BT) con 1000 repeticiones. Posteriormente, se realizó un árbol de distancia con el algoritmo de Unión de Vecinos (NJ) utilizando secuencias de referencia del GenBank (Liu *et al.*, 2016).

Tabla 4. Cebadores utilizados para la ampliación y secuenciación de la región ITS

CEBADORES		SECUENCIA 5' - 3'	FUENTE
ITS Universales	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White, 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Objetivo 3. Determinar la sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Colletotrichum* spp. en ñame a fungicidas de síntesis química

a) Inhibición del crecimiento micelial

Para la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) de cada aislamiento, se utilizó la técnica de difusión en agar, la cual consistió en mezclar cada concentración del fungicida con el medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA). Se evaluaron seis fungicidas y cuatro dosis (tabla 5), cada suspensión de fungicida (50 µl) se aplicó en la superficie de placas Petri con PDA usando un asa de Drigalsky. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente para permitir que el fungicida se difunda a través del agar. Las placas modificadas con fungicida se sembraron con discos de micelio de 0,7 cm de 11 aislados crecidos durante ocho días y un testigo experimental que correspondía a la siembra de las cepas en medio de cultivo sin fungicidas. Se establecieron dos discos por placa, para un total de cuatro repeticiones y luego se incubaron a 28 °C y se midió el crecimiento de micelio después de 72 horas (Forcelini *et al.*, 2016). El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 11 (aislados) x 6 (fungicidas) x 4 (dosis).

Los datos obtenidos fueron usados para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) del hongo, de la siguiente manera:

$$PICM = ((\text{crecimiento testigo} - \text{crecimiento tratamiento}) / \text{crecimiento testigo}) * 100$$

El análisis estadístico de los datos de PICM se realizó con el programa R-Studio v. 4.1.2. y se estimaron las diferencias entre los tratamientos mediante una prueba de comparación múltiple de Tukey al 5%.

Los datos de PICM se usaron para determinar la dosis letal al 50% (DL₅₀), esta se calculó mediante un análisis de regresión lineal a través de la porción lineal de la curva dosis-respuesta en el programa R-Studio v. 4.1.2 (R Core Team). Para los productos sistémicos, las cepas inhibidas con valores de DL₅₀ <10 ppm se consideraron susceptibles, las cepas inhibidas con valores de DL₅₀ de 10 a 100 ppm se agruparon como resistentes intermedias y los aislados con DL₅₀ valores mayores de 100 ppm fueron considerados altamente resistente (Torres *et al.*, 2015). Mientras que los fungicidas de contacto, se tomó como referencia la dosis discriminadora de 1000 ppm, considerándose como susceptibles las cepas inhibidas a dosis menores a 1000 ppm y como resistentes las inhibidas a dosis mayores de 1000 ppm (Moreira *et al.*, 2019).

Tabla 5. Fungicidas seleccionados para la evaluación in vitro de su eficacia en el control de aislamientos fúngicos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea spp*).

INGREDIENTE ACTIVO	GRUPO QUÍMICO	MODO DE ACCIÓN	Dosis evaluadas (ug i.a.ml ⁻¹ ; ppm o mg.L ⁻¹)	CODIGO FRAC
Azoxystrobin	Strobilurinas	Sistémico	1,3,5,10,	11
Benomyl	Benzimidazol	Sistémico	1, 3, 5, 10	1
Difenoconazol	Triazoles	Sistémico	1, 3, 5, 10	3
Mancozeb	Ditiocarbamato	Contacto	500, 1000, 1500, 2000	M 03
Captan	Ftalimida	Contacto	500, 1000, 1500, 2000	M 04
Clorotalonil	cloronitrilos	Contacto	500, 1000, 1500, 2000	M 05

b) Inhibición de la germinación de conidias

En este ensayo se emplearon los mismos fungicidas y concentraciones del ensayo de inhibición micelial. El efecto antifúngico fue evaluado con un ensayo colorimétrico utilizado para determinar la absorbancia (450 nm) utilizando microplatos (Nunc-Immuno). Las soluciones constaron de 100µl de solución de conidios (10^6 conidio/ml), 400µl de caldo de dextrosa de papa, luego se le añadió la cantidad requerida para cada fungicida (Tabla 5) más agua destilada estéril para un volumen final de 1000µl.

La mezcla fue llevada a vortex por 5-10 segundos, luego se colocaron 100µl de la solución por triplicado. El testigo consistió en soluciones de conidias con agua destilada estéril. Para todos los tratamientos probados, se prepararon mezclas idénticas sin conidios y se agregaron a la misma placa para servir como controles para probar los cambios en la absorbancia debidos a transformaciones químicas de los productos. La placa de 96 pocillos se incubó durante 72 horas a 28°C y se midió la densidad fúngica (450nm) con un lector universal de microplacas. El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial AxBxC: 11 aislados (A), 6 fungicidas (B) y 4 dosis(C). El análisis estadístico de los datos de la absorbancia se realizó con el programa R-Studio v. 4.1.2 y se estimaron las diferencias entre los tratamientos mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey al 5%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Objetivo 1. Relacionar los diferentes síntomas de la antracnosis del ñame, con la morfología de los diferentes aislados de *Colletotrichum* spp., asociados con la enfermedad

a) Descripción de síntomas de la antracnosis en ñame

Mediante observaciones en el follaje, se logró identificar diferentes síntomas asociados a la antracnosis en ñame. Teniendo en cuenta la forma, el tamaño y el color de las lesiones, se clasificaron nueve tipos de síntomas en los cultivares de ñame, estos fueron divididos en dos grupos como; siete tipos de lesiones y dos tipos de necrosis (Figura 3). La sintomatología encontrada se describe a continuación.

Lesión tipo 1: redonda, regular de color café oscuro con halo amarillo; Lesión tipo 2: alargada e irregular de color café oscuro, la cual crece a lo largo de la nervadura y está rodeada por un halo amarillo; Lesión tipo 3: irregular de color café oscuro con anillos concéntricos y centro gris, presenta un halo amarillo; Lesión tipo 4: redondeada de color café oscuro rodeada por un halo amarillo intenso; Lesión tipo 5: Pequeños puntos café rojizo dispersos en la lámina foliar, rodeados por un halo amarillo; Lesión tipo 6: forma irregular de color gris rodeadas con un borde café oscuro; Lesión tipo 7: redondeada con centro café oscuro, rodeada por un anillo de color café claro y un halo amarillo. Necrosis tipo 1: lesión larga de color café, rodeada por una mancha verde oliva que crece desde el ápice de la hoja y se extiende hacia adentro; Necrosis tipo 2: lesión grande, grisácea rodeada por una mancha verde oliva que inicia del borde de la lámina foliar y se extiende hacia adentro.

La sintomatología observada en el cultivo de ñame es específica de cada especie. *D. alata* se caracteriza por presentar una mayor número de lesiones, destacándose las de tipo 1, 2, 3, 5, y 6, mientras que en la especie *D. rotundata* predominan las lesiones tipo 4, 7 y las necrosis tipo 1 y 2. Cabe resaltar que una sola planta puede presentar diferentes síntomas, incluso en la misma hoja.

Esta clasificación y descripción de síntomas coincide con los resultados encontrados por Ayodele *et al* (2006), donde se reporta que el género *Colletotrichum* produjo diferentes síntomas en campos experimentales y de multiplicación de ñame, evidenciándose siete tipos de lesiones y cuatro necrosis. La variabilidad de los síntomas en la antracnosis del ñame ha sido ampliamente reportada y se han mencionado lesiones café oscuras regulares, irregulares, circulares, coalescentes, no coalescentes, con halos cloróticos, produciendo necrosis extensiva de las hojas y muerte regresiva del tallo (Abang *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2003; Ayadole *et al.*, 2006; Abang *et al.*, 2009).

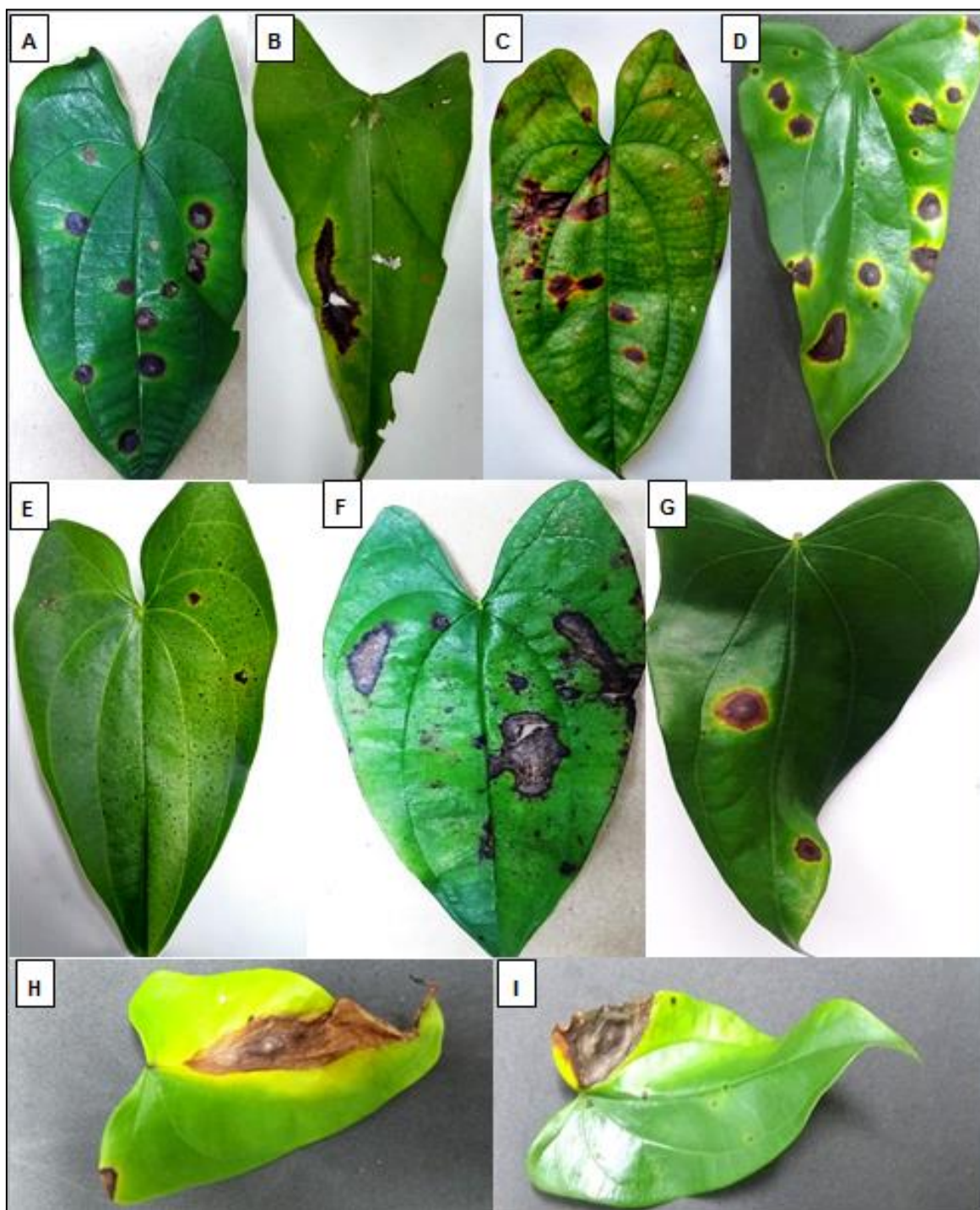


Figura 3. Síntomas de antracnosis asociadas al cultivo de ñame. **A:** Lesión tipo 1, **B:** Lesión tipo 2, **C:** Lesión tipo 3, **D:** Lesión tipo 4, **E:** Lesión tipo 5, **F:** Lesión tipo 6, **G:** Lesión tipo 7, **H:** Necrosis 1, **I:** Necrosis 2.

La diferencia de los síntomas se puede atribuir a la presencia de diferentes especies del género *Colletotrichum* que afectan el cultivo de ñame (Abang *et al.*, 2002; Frétzal *et al.*, 2012; Pinzón, 2014). Investigaciones han mostrado la interacción de diferentes especies del género *Colletotrichum* con los síntomas de antracnosis en el mismo hospedero (Liu *et al.*, 2016; Tovar *et al.*, 2020; Xavier *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

b) Obtención de cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp.

Se obtuvo un total de 11 aislados monospóricos a partir de los síntomas descritos, los cuales fueron identificados con las siglas “DA” para los aislados de *Dioscorea alata* y “DR” para los aislados de *Dioscorea rotundata*, se le agregó la letra “L” si el síntoma provenía de una lesión con forma definida o la letra “N” si era una necrosis; por último se le asignó el número que representa el síntoma descrito. De las lesiones tipo 2 y 5 se obtuvieron dos aislados de la misma lesión, por lo que se le agregó la letra “B” al segundo aislado (Tabla 6). Posteriormente, se seleccionaron los aislamientos para determinar sus características morfológicas, patogénicas y moleculares.

Tabla 6. Aislamientos de *Colletotrichum* spp. colectados de plantas de ñame

AISLAMIENTO	HOSPEDANTE
DAL1	<i>D. alata</i>
DAL2A	<i>D. alata</i>
DAL2B	<i>D. alata</i>
DAL3	<i>D. alata</i>
DRL4	<i>D. rotundata</i>
DAL5A	<i>D. alata</i>
DAL5B	<i>D. alata</i>
DAL6	<i>D. alata</i>
DRL7	<i>D. rotundata</i>
DRN1	<i>D. rotundata</i>
DRN2	<i>D. rotundata</i>

DA = *Dioscorea alata*; DR = *Dioscorea rotundata*; L = lesión; N= necrosis

c) Características morfológicas de *Colletotrichum* spp.

Las características morfológicas y culturales de 11 aislados seleccionados de especies de *Colletotrichum* fueron evaluados con el coeficiente de similitud y distancias de Gower y se construyó un dendrograma con el método de Ward, el cual permitió clasificar los once aislamientos en tres grupos según características morfológicas y culturales.

El dendrograma fue analizado a una distancia aproximada de 55 y muestra los tres grupos con características similares de los descriptores evaluados (Figura 4). El uso de estos métodos se justificó porque los descriptores empleados para caracterizar los 11 aislados eran mixtos; siete cualitativos, cuatro cuantitativos y tres binarios (Dongo, 2017; Espinel, 2019).

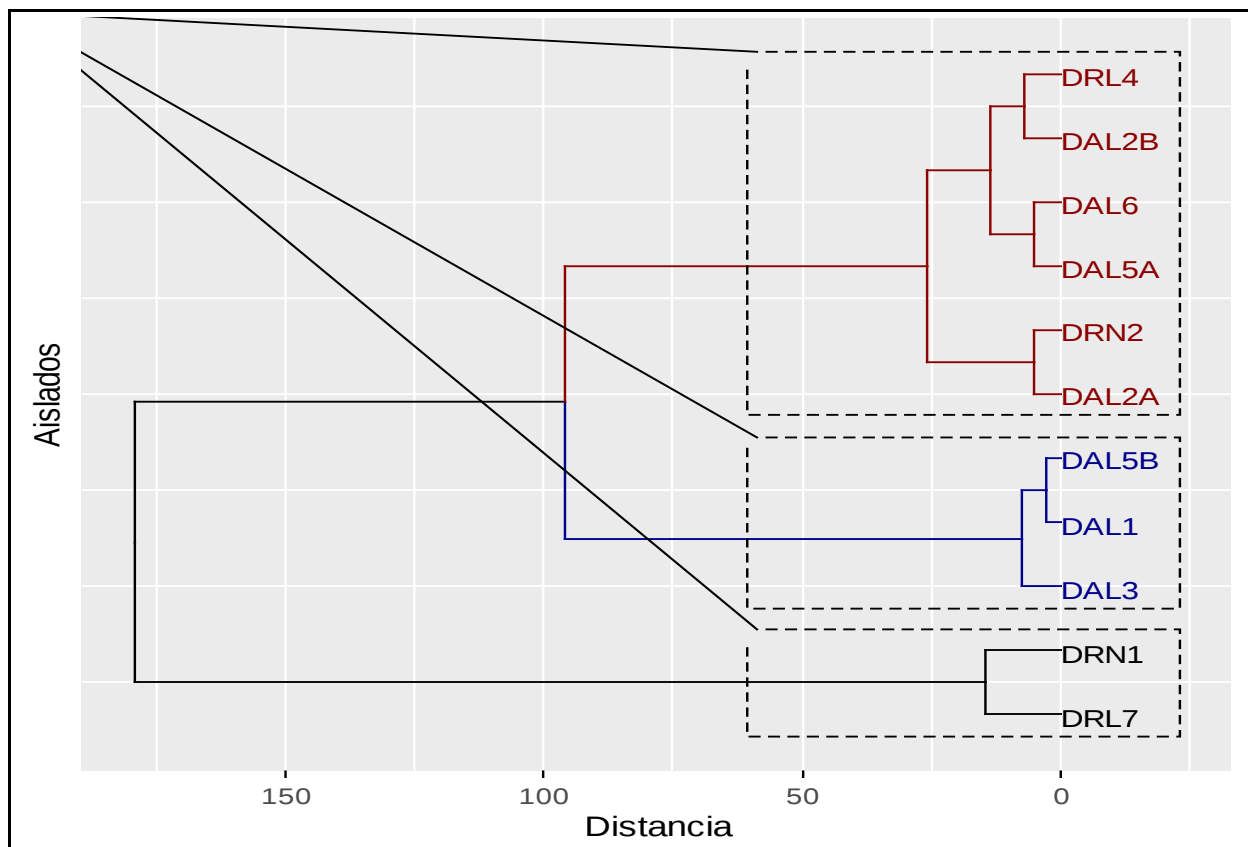


Figura 4. Dendrograma de las variables morfológicas de aislados de *Colletotrichum* spp. del cultivo de ñame.

Los rasgos morfológicos de los aislados mostraron diferencias entre sí. Los descriptores empleados que presentaron las mayores frecuencias relativas fueron: la textura algodonosa con 72,72%, crecimiento elevado 63,63%, abundante esporulación 72,72%, la cual se manifiesta con la producción de un exudado de color anaranjado, amarillo o salmón. El color de la superficie de la colonia fue variable predominando el color blanco 72,72%; mientras que, en el reverso predominó el color salmón 63,63%.

Las conidias de los 11 aislados fueron hialinas y el largo osciló entre 14,52 a 18, 24 μ , el ancho en el punto central osciló entre 4,63 y 7,85 μ . Los conidios fueron de dos tipos, unos de forma cilíndrica 63,63% y los otros tenían en un extremo una base cilíndrica y en el otro cónico 36,36%. Los acérvulos son variables en color y tamaño de las setas, agrupándose por color así: el 27,27% de los aislados fueron amarillos, el 36,36% anaranjados y el 36,36% salmón. El tamaño de los acérvulos estuvo entre 150,15 a 248,43 μ , presentaron pocas setas, donde el 54,45% fueron largas con 136 μ y el 45,45% fueron cortas. Los descriptores cuantitativos que más participaron para identificar los grupos fueron el largo de las conidias, y el tamaño del acérvulo, siendo estas características importantes en la formación de los tres grupos (figura 4). Para tener una descripción más detallada, los tres grupos de aislados de *Colletotrichum* se caracterizan de manera general a continuación:

El grupo1, lo componen seis aislado DAL2B, DRL4, DAL5A, DAL6, DAL2A,DRN2, cuatro de *D. alata* y dos de *D.rotundata*, lo que evidencia por su similitud que no hay diferencias morfológicas entre aislados de *Colletotrichum*, causantes de la antracnosis en las dos especies de ñame estudiadas. Los aislados DAL2B y DAL2A, obtenidos del mismo tipo de lesión no se diferenciaron morfológicamente; mientras que, los aislados DAL5A y DAL5B que se aislaron de la lesión tipo 5 de *D. alata* presentaron diferencias morfológicas por lo cual se agruparon en grupos diferentes. El largo de las conidias de este grupo osciló entre 14,51-16,91 μ , siendo considerado como el grupo con las conidias más pequeñas. Los acérvulos tuvieron un largo 172-195 μ .

El grupo 2, lo conforman tres aislamientos provenientes de *D. alata*, DAL3, DAL1, DAL5B, los cuales fueron aislados de lesiones tipo 3, tipo1, y tipo 5. El largo de las conidias osciló entre 16,78-18,12 μ y los acérvulos midieron entre 150-156 μ , considerándose este grupo como el de los acérvulos más pequeños.

El grupo 3, aglomeró dos aislados de *D. rotundada*, el DRL7 que causa lesión tipo 7; mientras que el DRN1 es causante de necrosis. Esto muestra que a pesar de haberse encontrado en la misma especie, puede causar tanto lesiones típicas puntuales como necrosis (Figura 3). Las conidias tuvieron un largo de 18,24 μ y el largo de los acérvulos osciló entre 233-248 μ , siendo caracterizado este grupo por tener los aislados con las conidias y los acérvulos más grandes.

Las características morfológicas de estos tres grupos de aislamientos coinciden con las descripciones realizadas por otros autores que han trabajado en el mismo patosistema (Green y Simons, 1994; Abang *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2018). Estos grupos comparten características con los aislados estudiados por Abang *et al.* (2002), donde clasificaron aislamientos de *C. gloeosporioides* en ñame según el color de la colonia y la tasa de crecimiento, y se categorizaron en cuatro grupos: el gris de rápido crecimiento (FGG); oliva de crecimiento rápido (FGO); salmón de crecimiento rápido (FGS); aislados grises de crecimiento lento (SGG).

Los rasgos morfológicos se han usado para clasificar diferentes especies del género *Colletotrichum* y aislamientos dentro de la misma especie, donde la forma de las conidias es el criterio más usado (Beltrán, 2000); en ñame se identificó *C. gloeosporioides*, basándose en la producción de fructificaciones acervulares con conidios ovales a oblongos o cilíndricos (Green *et al.*, 1998; Abang *et al.*, 2001). Otras investigaciones mostraron la diversidad morfológica de *C. gloeosporioides* y la presencia de *C. dematium* y *C. alatae* en ñame (Castro *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2018).

Al comparar nuestros resultados con estudios de caracterización de *Colletotrichum* de otras plantas hospederas, los aislados mostraron similitud con los grupos 1, 2 y 6 identificados como *C. gloeosporioides*, *C. fruticola* y *C. brevisporum* por Liu *et al.* (2016) en cultivos de *Capsicum annuum* en china. Del mismo modo se evidencia similitud con las características morfológicas de *Colletotrichum* descritas en cultivos de Mango, Tomate de árbol, café y aguacate (Pardo *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2020; Fuentes *et al.*, 2020).

A pesar que los caracteres morfológicos han sido usados ampliamente para identificar especies del género *Colletotrichum*, éstos pueden verse afectados por factores ambientales en la expresión genética y el fenotipo del hongo, haciendo difícil su clasificación (Beltrán, 2000; Cao *et al.*, 2020). No obstante, estas inexactitudes se han superado en gran medida mediante el uso de métodos moleculares para diferenciar especies de *Colletotrichum* (Abang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018).

d) Patogenicidad de los aislados

Los síntomas de la antracnosis en las hojas inoculadas y sometidas a cámara húmeda, iniciaron a los cinco días después de la inoculación. La evaluación de la severidad se hizo a los ocho días después de la inoculación; los 11 aislados mostraron ser patogénicos al menos en una de las siete accesiones de ñame. Las hojas no inoculadas, tomadas como testigo no mostraron síntomas de la enfermedad. El síntoma observado en las accesiones susceptibles, fue el desarrollo de una lesión café oscura, coalescente que produjo necrosis extensiva de la hoja y sobre la lesión la presencia de acérvulos con masas de conidias de color salmón (Figura 5).

Este tipo de síntoma ha sido reportado al inocular hojas sueltas de ñame a nivel de laboratorio con diferentes aislados de *Colletotrichum* spp., además se han descrito dos síntomas característicos i) la lesión típica que es una necrosis grande, marrón oscuro, coalescente, alta tasa de expansión y ii) la lesión puntual, que consta de pequeños puntos de menos de 2 mm de diámetro, negros, no coalescente (Winch *et al.*, 1984; Frézal *et al.*, 2012; Frézal *et al.*, 2018). Estudios de la etiología de la antracnosis del ñame (*D. rotundata* y *D. alata*) en Nigeria, revelaron que los síntomas desarrollados luego de la inoculación con aislados de *C. gloeosporioides* en hojas y tallos, fueron la formación de regiones necróticas en ambas variedades (Gwa *et al.*, 2015).



Figura 5. Síntomas de antracnosis en hojas de ñame *Dioscorea alata*, en cámara húmeda, ocho días después de la inoculación con aislados de *Colletotrichum* spp.

El rango de hospederos de los 11 aislados de *Colletotrichum* spp. fue variable en el número de accesiones afectadas, no hubo un aislado agresivo con capacidad de afectar a las siete accesiones de ñame (Tabla 7). Los genotipos más afectados fueron el DA-045 el cual fue colonizado por todos los aislados, seguido por la accesión DA-047 quien fue afectado por nueve aislados.

El aislado que tuvo el mayor rango de hospederos fue el DRL4, afectando a cinco accesiones, seguido por DAL6 y DRL7 con cuatro hospederos. Este comportamiento muestra la capacidad que tienen algunos aislados de afectar tanto a las accesiones de *D. alata* como a las de *D. rotundata*. La habilidad que tienen algunas cepas de causar lesiones patógenas en diferentes especies del género *Dioscorea* fue reportada por Abang *et al.* (2002) cuando hizo inoculación cruzada con aislamientos de *Colletotrichum* spp. de tres especies de ñame (*D. alata*, *D. rotundata* y *D. dumetorum*) y de tres especies de malezas. Además, Appiah *et al.* (2016) estudiando la variabilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal de la antracnosis de yuca y ñame en Ghana, evidenciaron que los aislamientos de ñame causaron lesiones en secciones de plantas de yuca y ñame y viceversa.

Tabla 7. Rango de hospederos de 11 aislados de *Colletotrichum* sobre accesiones de ñame.

ACCESIONES DE ÑAME	DA- 047	DA- 045	DA- 063	DA- 020	DR- 088	DR- 157	DR- 167	RANGO DE HOSPEDEROS
AISLADOS DE <i>Colletotrichum</i>								
TESTIGO	-	-	-	-	-	-	-	0
DAL1	+	+	-	-	-	-	+	3
DAL2A	-	+	+	-	+	-	-	3
DAL2B	+	+	-	-	-	-	-	2
DAL3	+	+	+	-	-	-	-	3
DRL4	+	+	+	+	-	-	+	5
DAL5A	+	+	-	-	-	-	+	3
DAL5B	-	+	-	-	-	-	+	2
DAL6	+	+	-	+	-	-	+	4
DRL7	+	+	+	-	-	-	+	4
DRN1	+	+	-	-	-	-	+	3
DRN2	+	+	-	-	-	-	+	3
N° Aislados	9	11	4	2	1	0	8	

*símbolo (+) = patogenicidad del aislado en la respectiva accesión; símbolo (-)= aislado no patogénico en la accesión

La virulencia de los aislados se determinó con la escala de severidad propuesta por (Nwadike *et al.*, 2017) evaluándose el experimento a los 8 días después de la inoculación. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los aislados, las accesiones de ñame y la interacción entre los aislados y las accesiones $P < 0,05$ (Tabla 8). La virulencia de los aislados fue variable y depende de la resistencia de los genotipos.

Tabla 8. Análisis de varianza para la variable severidad de la antracnosis: Los valores de severidad se han reemplazado por rangos.

Fuentes de variación	GL	P-Valor
TRATAMIENTOS	83	<.0001
AISLADOS (A)	11	<.0001
ACCESIONES (B)	6	<.0001
INTERACCION A*B	66	<.0001

*GL: Grados de libertad

Al realizar la comparación de medias con la prueba del rango múltiple de Duncan para la variable severidad de los aislados de *Colletotrichum* spp (Figura 6). se evidenció que los más virulentos fueron los aislados DRL4, DAL5A, DRN1, DAL3, DRL7, DAL1, los cuales afectan en promedio entre el 40,9% y 49,5%, del área foliar de las hojas de ñame, clase 5 en la escala empleada; estos fueron estadísticamente iguales entre sí y superan la media de los demás aislados evaluados. Luego le siguen los aislados DRN2, DAL6, DAL2B, DAL2A, DAL5B, que afectan en promedio entre 31% y 37% del área foliar la accesión, correspondiendo a la clase 4, este grupo no presenta diferencia estadística entre si y superan al testigo. Trabajos realizados con aislados de *Colletotrichum* en ñame han mostrado diversos grados de virulencia sobre materiales susceptibles y resistentes, lo anterior sugiriere la existencia de posibles razas fisiológicas dentro de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. (Mignouna *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2003; Jiménez *et. al.*, 2009; Frezál *et al.*, 2012). Otras investigaciones reportan cuatro formas de *Colletotrichum* que representan tres fenotipos de virulencia distintos asociados con la antracnosis foliar del ñame: el gris de crecimiento lento altamente virulento (SGG); el salmón de crecimiento rápido moderadamente virulento (FGS); el gris débilmente virulento de rápido crecimiento (FGG); y el morfotipo de color olivo de crecimiento rápido moderadamente virulento (FGO) (Abang *et al.*, 2001; Abang *et al.*, 2002; Abang *et al.*, 2006).

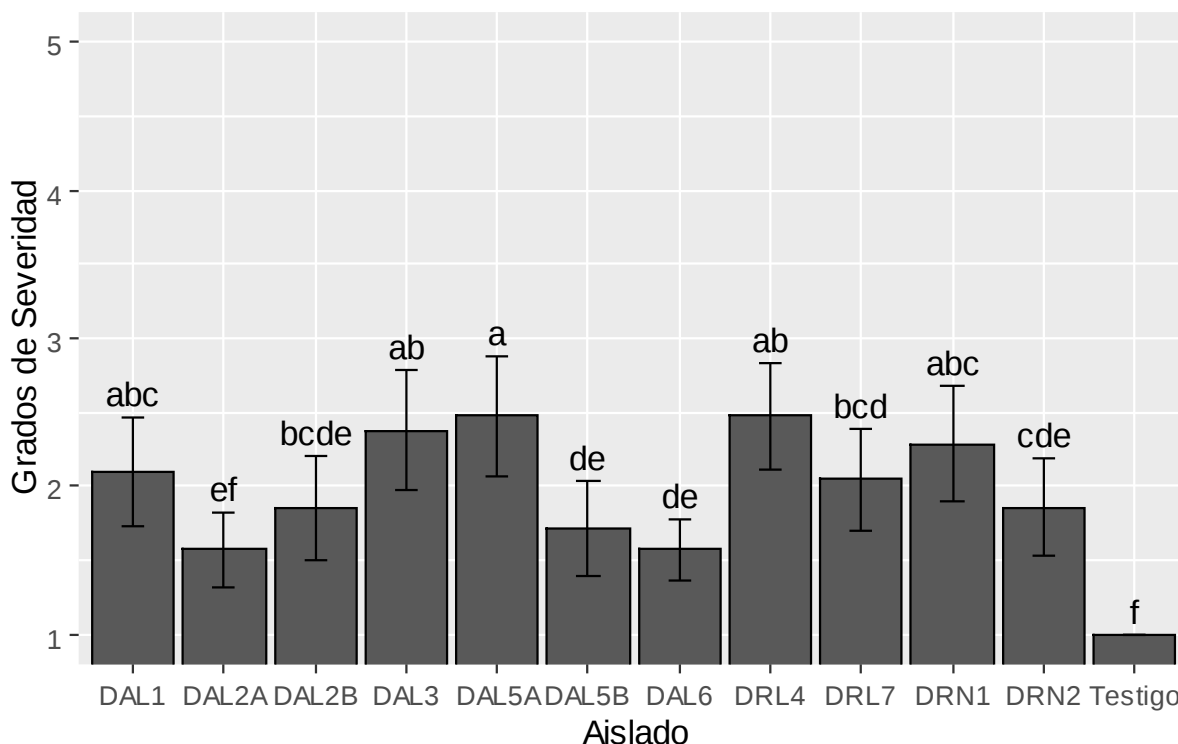


Figura 6. Virulencia de 11 aislados de *Colletotrichum* spp. sobre siete accesiones de ñame. Severidad medida con escala de porcentaje de área afectada de 1 a 5 (1= 0-5%, 2= 5-10%, 3=10-25%, 4 = 25-50%, 5= >50%). Medias con una letra común son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) según la prueba de comparación múltiple de Duncan.

La comparación de medias con la prueba del rango múltiple de Duncan para la severidad de las accesiones de ñame, teniendo en cuenta el parámetro de clasificación de severidad de la antracnosis; mostró diferencias significativas entre las accesiones, donde se evidencia que el material DA-045 mostró el mayor porcentaje de severidad (25% - 50%), el cual es estadísticamente diferente a los demás materiales y es clasificado como susceptible. Los genotipos DA-047 y DR-167 no presentaron diferencias estadísticas entre si y se clasificaron como moderadamente resistentes a la enfermedad, con porcentajes de severidad entre 10% y 25%. Se encontró que DA-020 y DA-063 se comportaron estadísticamente igual, clasificándose así como resistentes. Por ultimo las accesiones DR-157 y DR-088 se clasificaron como altamente resistente y resistentes, mostrando que la severidad oscilo entre 0% y 10% (Figura 6).

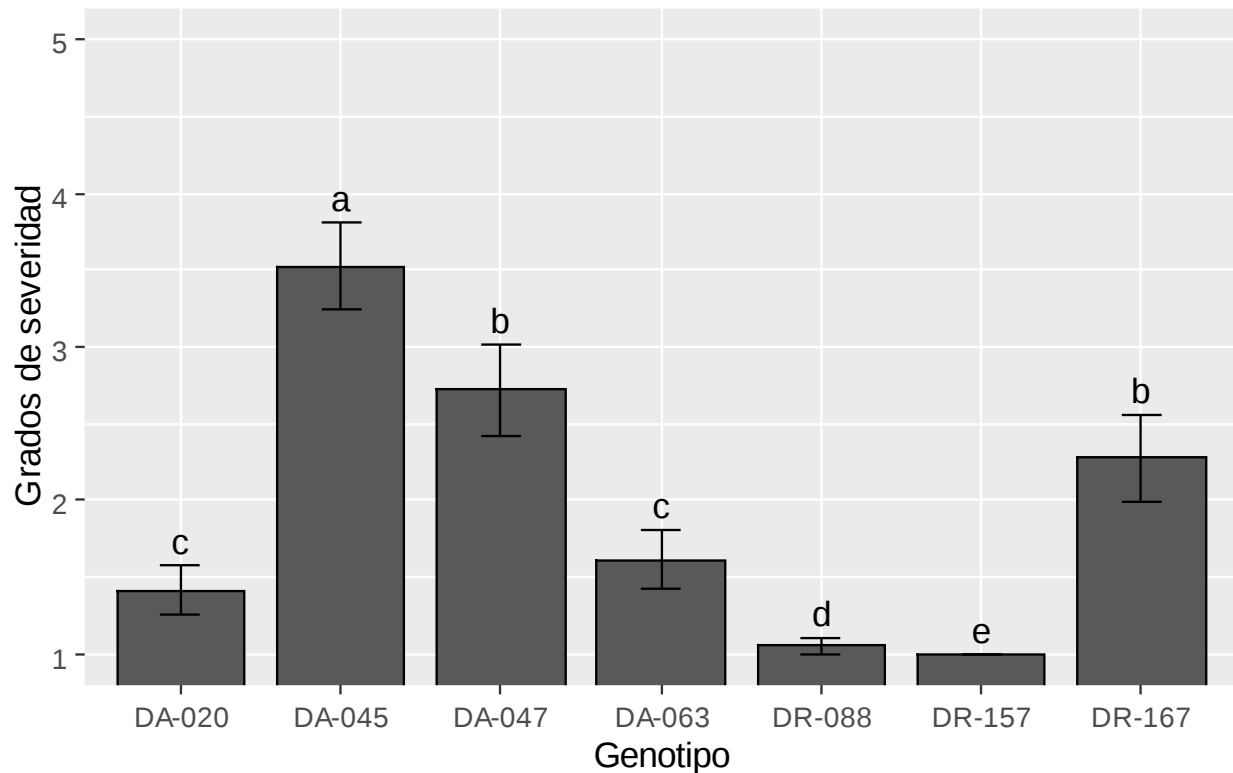


Figura 7. Resistencia de siete genotipos de ñame a 11 aislados de *Colletotrichum* spp. *D. alata* estuvo representado por las accesiones DA-020, DA-045, DA-047y DA-063. *D. rotundata* estuvo representado por las accesiones DR-068, DR-157 y DR-167. Severidad medida con escala de porcentaje de área afectada de 1 a 5 (1= 0-5%, 2= 5-10%, 3=10-25%, 4 = 25-50%, 5= >50%). Medias con una letra común son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) según la prueba de comparación múltiple de Duncan.

La antracnosis afectó a casi todas las especies cultivadas de ñame, siendo las especies criollas (*Dioscorea alata*) las más susceptibles a la enfermedad (Winch *et al.*, 1984; Mignucci *et al.*, 1988; Onyeka *et al.*, 2006). En esta investigación se evidenció que dos materiales de *D. alata* fueron resistentes, comportándose de manera similar a *D. rotundata*, considerada como altamente resistente a la enfermedad (Figura 7). Un estudio similar, mostró la resistencia a la antracnosis de diferentes especies de ñame, donde la severidad de la enfermedad en *D. rotundata* y *D. alata* estuvo entre 9,18% y 10,58% (Gwa *et al.*, 2015). En anteriores investigaciones de la universidad de Córdoba, fueron identificadas 13 accesiones de *D. alata* con diferentes grados de resistencia, de las cuales se seleccionaron cinco, por presentar resistencia a la antracnosis, buenos rendimientos y características morfológicas exigidas en el mercado nacional (Campo, 2011).

En los últimos años se han usado diferentes parámetros para seleccionar con éxito genotipos resistentes a la antracnosis, como la severidad de la enfermedad en las hojas desprendidas en el laboratorio, la severidad en plantas bajo condiciones de campo e invernadero, el tamaño de la lesión y la producción de esporas (Nwadike *et al.*, 2017). Evaluaciones de resistencia de genotipos de ñame a la antracnosis, en condiciones de campo y laboratorio han permitido identificar genotipos de ñame resistentes y susceptibles a aislados de *Colletotrichum* (Nwadike *et al.*, 2017; Arya *et al.*, 2019).

El efecto de la interacción genotipos por aislados de *Colletotrichum* sp. mostró diferencias significativas entre la combinación DAL2B x DA-045 con respecto a las demás combinaciones, esta mostró mayor severidad de la enfermedad, resultando que el hospedero fue altamente susceptible a este aislado. Además la combinación DAL3 x DA-045, DAL3 x DA-063 fueron significativas y estadísticamente iguales entre sí, mostrándose como susceptibles para este aislado. La interacción DRL4 x DA-047, DA-045, DA-063, DA-020 y DR-167 resultaron significativas, observándose que las accesiones son susceptibles a este aislado, pero no tiene la capacidad de afectar a los materiales DR-088 y DR-176, siendo estos altamente resistentes al patógeno. La combinación DAL5A x DA-045, DA-0463 y DR-167 mostraron significancia estadística, presentaron la mayor media y fueron estadísticamente superiores con el resto de las interacciones. En esta combinación, las accesiones fueron altamente susceptibles y susceptibles al aislado. La interacción DAL5B x DA-045 fue significativa, fue clasificada como altamente susceptible al aislado y fue estadísticamente igual a la interacción con DR-167; ambas superan a las demás interacciones, las cuales resultaron altamente resistentes. Las combinaciones DRN1 x DA-047, DRN1 x DA-045 y DRN1 x DR-167 fueron significativas, estas resultaron como altamente susceptible, susceptible y moderadamente resiste al aislado, el resto de combinaciones fueron altamente resistente (Figura 8).

Las reacciones específicas de aislados *Colletotrichum* spp. en ñame han mostrado diferentes grados de susceptibilidad y resistencia en cultivares, indicando que algunos genotipos tienen resistencia específica (Onyeka *et al.*, 2006). Los determinantes genéticos de la interacción entre *C. gloeosporioides* y *D. alata* son poco conocidos. Los primeros reportes indicaban que esta resistencia era poligénica (Green y Simons, 1994). Mignouna *et al.* (2001) investigaron la herencia de la resistencia a una cepa moderadamente virulenta de *C. gloeosporioides* en cruces entre genotipos susceptibles y resistentes de *D. alata*, encontrando que la resistencia se hereda de manera dominante y sugiere que más de un gen controla la herencia de la resistencia. No obstante, Pétró *et al.* (2011) proporcionó evidencias de herencia cuantitativa y un componente gen por gen asociados con la resistencia de *D. alata*. Por ejemplo, el locus dominante único (Cdg1) explica la resistencia específica del cv TDa-95/00328 a cepas de *C. gloeosporioides* moderadamente virulentas (Mignouna *et al.*, 2002). Un estudio sobre la adaptación de un patógeno fúngico a una resistencia cuantitativa del hospedero, reveló que las poblaciones de *C. gloeosporioides* están adaptadas a la resistencia de sus hospederos (Frezal *et al.*, 2018). Actualmente se demostró que la inmunidad entre

los cultivares de ñame resistentes y susceptibles depende de la producción de fitohormonas defensivas como el etileno (Hua *et al.*, 2020).

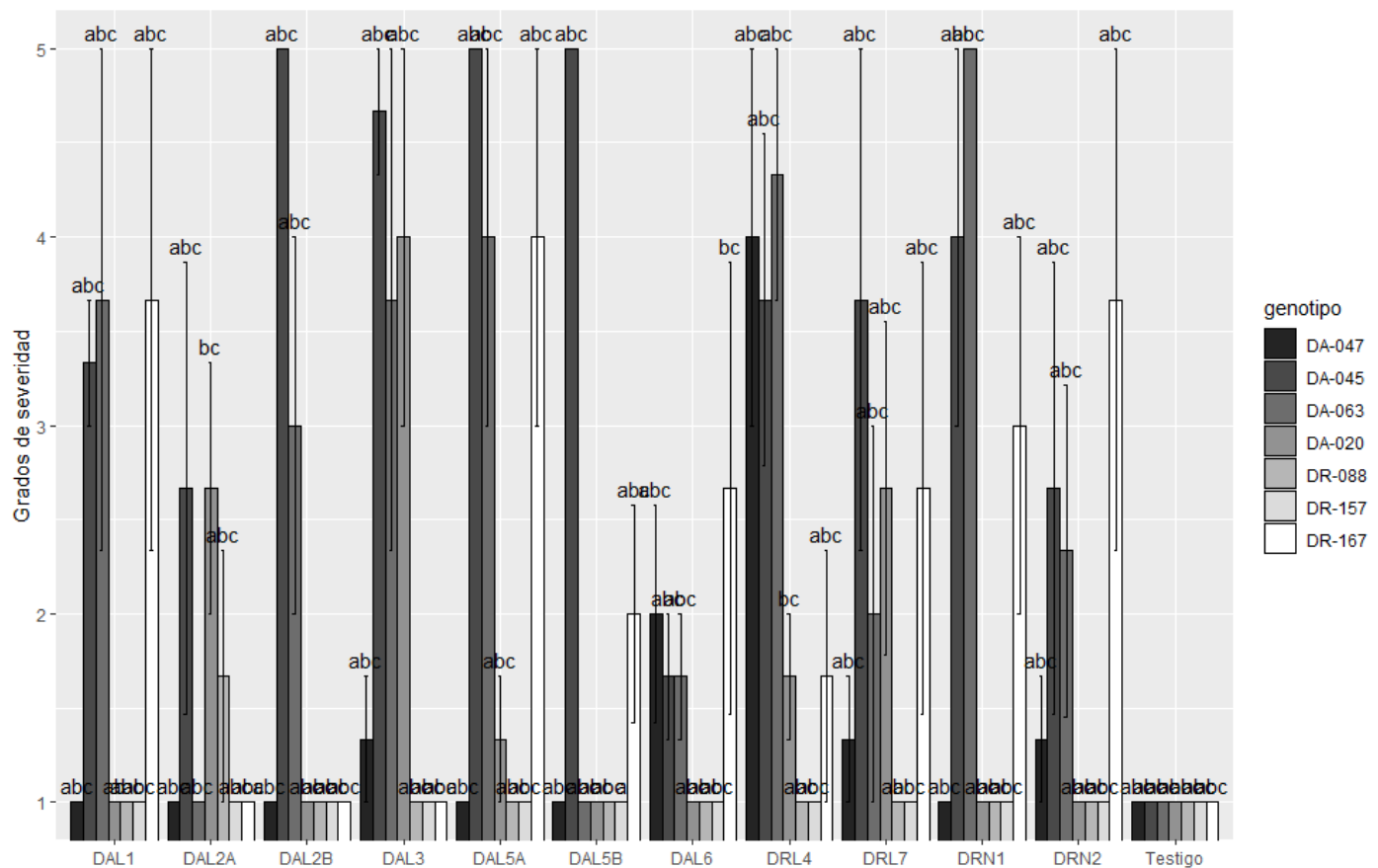


Figura 8. Efecto de la interacción genotipo y aislado sobre la severidad de la enfermedad. *D. alata* estuvo representado por las accesiones DA-020, DA-045, DA-047y DA-063. *D. rotundata* estuvo representado por las accesiones DR-068, DR-157 y DR-167. Severidad medida con escala de porcentaje de área afectada de 1 a 5 (1= 0-5%, 2= 5-10%, 3=10-25%, 4 = 25-50%, 5= >50%). Medias con una letra común son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) según la prueba de comparación múltiple de Tukey*

El conocimiento de la variación de las características morfológicas, genéticas y de patogenicidad, obtenido mediante estudios de las poblaciones de patógenos, es valioso para planificar medidas eficaces de manejo de enfermedades, como el uso de genes de resistencia o la aplicación de fungicidas (Brown, 2006). Actualmente es de gran importancia la identificación y selección de genotipos de ñame resistentes a la antracnosis, principalmente las variedades criollas (*D. alata*) que son las más susceptibles a la enfermedad y además, juegan un papel importante en la economía de la región y la dieta de los habitantes de la Costa Caribe colombiana.

En este sentido, las evaluaciones de germoplasma bajo un ambiente controlado que favorece la infección por patógenos y el desarrollo de enfermedades han permitido seleccionar genotipos promisorios con resistencia a la antracosis. Con base a lo anterior se pudieron clasificar los siete genotipos evaluados con diferentes grados de susceptibilidad y resistencia a la antracnosis en ñame, quedando distribuidos de la siguiente manera (Tabla 9).

Tabla 9. Clasificación de la resistencia de siete accesiones de ñame, a 11 aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculadas en hojas, bajo condiciones de laboratorio

ACCESION	GRADO DE RESISTENCIA
DR-157	AR
DA-063	R
DA-020	R
DR-088	R
DR-167	MR
DA-047	S
DA-045	AS

*Clasificación severidad (Nwadike *et al.*, 2017) donde AR=altamente resistente; R= resistente; AS=alta susceptibilidad; S= susceptible

Objetivo 2. Determinar la variabilidad genética de aislados de *Colletotrichum* spp. asociados con la antracnosis del ñame, mediante la secuenciación parcial de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS).

a) Extracción de ADN

La extracción de ADN de los 11 aislados de *Colletotrichum* spp. con el protocolo de bromuro de hexadeciltrimetilamonio 2X (CTAB), fue de manera exitosa, se logró extraer ADN genómico de buena calidad y pureza, de forma sencilla, reproducible y con la cantidad necesaria para realizar las diferentes técnicas moleculares que requieran ADN puro. Este método inicialmente fue presentado como un método para el aislamiento rápido de ADN vegetal de alto peso molecular (Murray y Thompson, 1980), sin embargo, la técnica es ideal para el aislamiento rápido, económico y constante de ADN de muestras de hongos (Tripathy *et al.*, 2017; Huanyu *et al.*, 2017; Inglis *et al.*, 2018), además, usar este método es menos costoso que usar un kit de extracción (Ivors, 2016).

b) Amplificación y secuenciación de Espaciadores Internos Transcriptos (ITS)

La amplificación con los primers universales para ITS y la posterior visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, mostró fragmentos de 300 pb (Figura 9). Los cebadores universales ITS reportados por White (1990) han sido ampliamente usadas para caracterizar aislados de *Colletotrichum* en ñame y otros hospederos (Abang *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2006; Pinzón *et al.*, 2006; Pinzón, 2014; Fernández *et al.*, 2020; Kwodaga *et al.*, 2020). Con base al diseño de estos cebadores se espera un tamaño para los productos de amplificación entre los 220 y 500 pb (White, 1990; Trejo *et al.*, 2017).

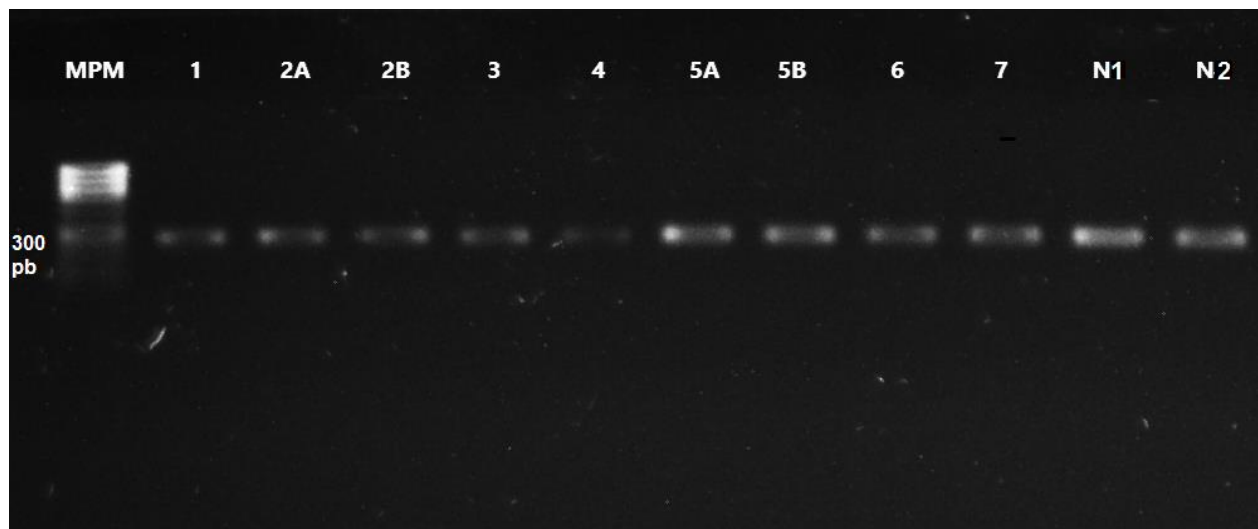


Figura 9. Amplificación de aislados del género *Colletotrichum* asociados al cultivo de ñame con cebadores ITS3 e ITS4. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular de 1 kb, aislados DAL1, DAL2A, DAL2B, DAL3, DRL4, DAL5A, DAL5B, DAL6, DRL7, DRN1, DRN2.

c) Análisis filogenético

Luego de la purificación de las muestras, estas se consideraron óptimas para la secuenciación, sin embargo, no se obtuvo secuencias del aislado DAL1, asociada al síntoma de lesión tipo 1.

El análisis de máxima parsimonia de las secuencias de la región ITS de ADNr de los 10 aislados, reveló dos clados primarios con altos porcentajes de replicación de bootstrap en los nodos internos del árbol (Figura 10A).

Para la identificación molecular de los diez aislados, las secuencias obtenidas fueron comparadas por similitud con las secuencias depositadas en el Gen Bank con la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Esto permitió identificar a los aislados del genero *Colletotrichum* a nivel de especies con porcentajes de identidad entre 95 y 100%. No obstante, se evidenció que algunos aislados compartían características similares con las especies *C. gloeosporioides* y *C. fructicola*, por tanto, se obtuvieron secuencias de estas dos especies del GenBank para tomarlas como referencias y *Cercospora beticola* se usó como grupo externo (outgroup), estas se alinearon y se construyó un árbol con el algoritmo de Unión de vecinos (NJ).

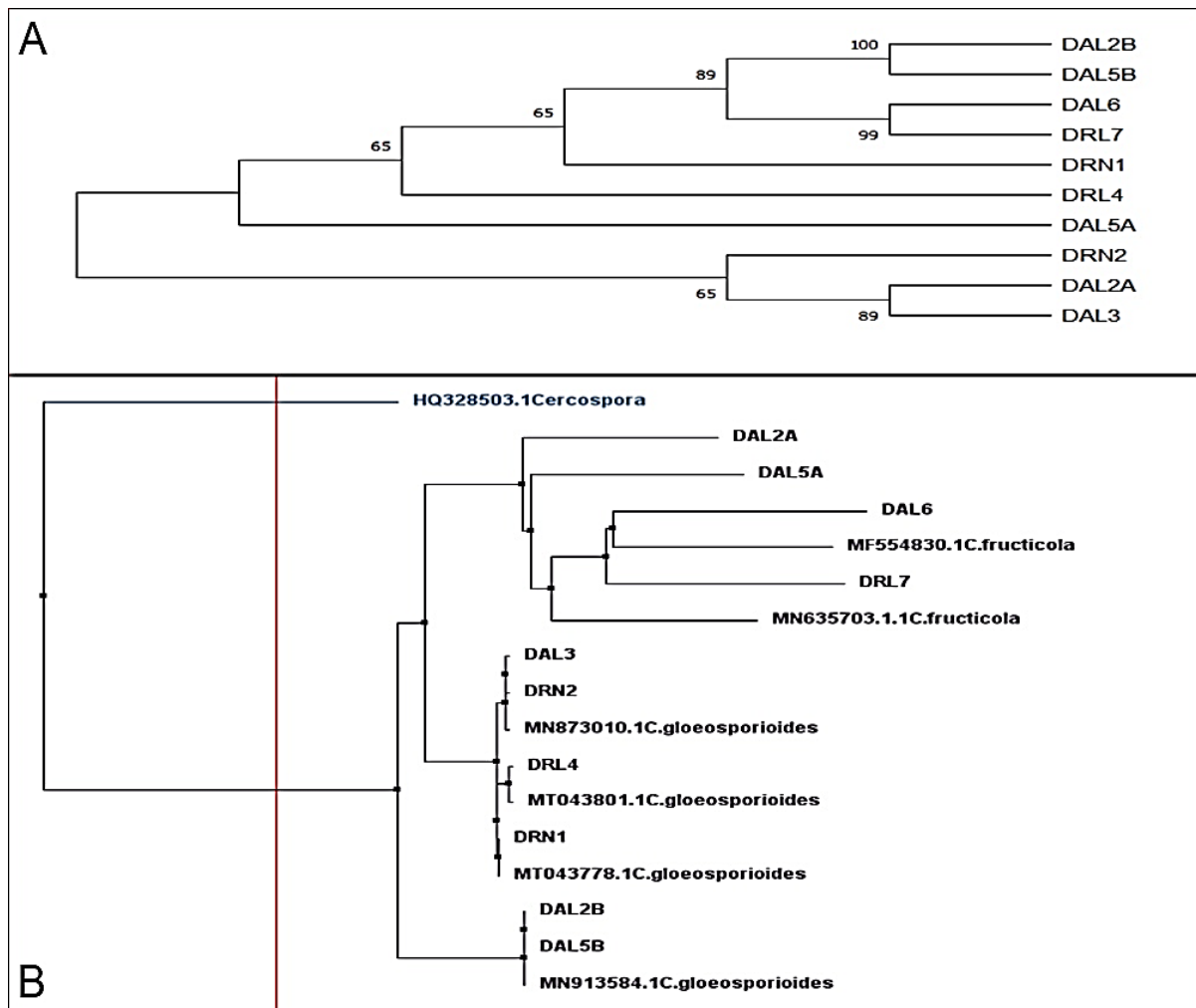


Figura 10. Árboles filogenéticos basado en la secuenciación parcial de genes ITS de especies de *Colletotrichum* y una especie externa (*Cercospora beticola*). **A:** Filograma generado con el método de máxima parsimonia (MP). Los valores de arranque de parsimonia de más del 50% se muestran en los nodos. **B:** Árbol de unión de vecinos (NJ) de secuencias problema y de referencias tomadas del GenBank.

Las topologías de los árboles de unión de vecinos (Figura 10B), fueron similares y consistentes con el árbol de consenso de máxima parsimonia (Figura 10A). Esto permitió agrupar a los aislados de *Colletotrichum* en dos clados. Clado I: formado por aislados de *C. fructicola*, los cuales incluían dos aislados de referencia y comparten similitud con los aislados DRL7, DAL6, DAL5A y DAL2A, mientras que el clado II, formado por *C. gloeosporioides*, incluyendo cuatro aislados de referencia que fueron similares a las cepas DAL3, DRN2, DRL4, DRN1, DAL2B y DAL5B. Además, el aislado de *Cercospora beticola* se mantuvo como grupo externo. Dentro del clado de *C. gloeosporioides*, los aislados más emparentados fueron DAL2B y DAL5B, los cuales se encuentran alejados del subgrupo formado por los aislados DAL3 y DRN2, a la vez, estos presentan un ancestro común con DRL4 y DRL1. Mientras que en el clado de *C. fructicola* los aislados más cercanos fueron DRL7 y DAL6 y comparten un ancestro común con DAL5A y DAL2A.

Los árboles obtenidos separaron molecularmente la colección de los aislados de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis del ñame en dos clados claramente visibles, lo que indica que existe alta variabilidad genética en la colección evaluada. Estudios anteriores han identificado molecularmente a *Colletotrichum gloeosporioides* como agente causal antracnosis del ñame en Nigeria (Abang *et al.*, 2002; Abang *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2006). No obstante, mediante estudios filogenéticos se han reportado diferentes especies asociadas a la antracnosis en ñame. Han *et al.* (2018) identificaron a *C. gloeosporioides* y *C. fructicola* afectando el cultivo de ñame en china. Los estudios de realizados por Weir *et al.* (2012) aceptan diferentes especies dentro del complejo de *C. gloeosporioides*, entre ellas incluyen a *C. fructicola*, además describen el aislado Cg13 reportado por Abang *et al.* (2002) como *C. fructicola* causando lesiones foliares en *Dioscorea alata* en Nigeria.

La enfermedad de la antracnosis se observó en forma severa en plantaciones de ñame en India y se identificó a *Colletotrichum capsici* asociado con la enfermedad, lo que motivó a varios a investigadores a buscar estrategias para el manejo del patógeno (Mahetre *et al.*, 2010; Jehani *et al.*, 2019). Otras investigaciones han reportado diferentes especies de *Colletotrichum* asociadas a este patosistema, tales como, *C. truncatum*, *C. dematium*, *C. theobromicola*, *C. alatae* (Rosado, 2016; Lin *et al.*, 2018). En Puerto rico, mediante la secuenciación parcial de los genes ITS, GAPDH y β -tubulina se caracterizaron 22 aislamientos del género *Colletotrichum* obtenidos de bancos de germoplasma y cultivos comerciales y se logró la identificación de la especies *C. gloeosporioides*, *C. ignotum*, *C. tropicale*, *C. aoteora*, *C. truncatum*, *C. alatae*, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. siamense* y *C. cliviae* (Fuentes, 2015). Muchas de las especies no se pueden distinguir de manera confiable utilizando ITS, particularmente en especies genéticamente cercanas, por lo que se recomienda el un análisis multilocus (Weir *et al.*, 2012).

La especie *Colletotrichum gloeosporioides* se caracteriza por tener una variabilidad genética alta (Weir *et al.*, 2012), en el cultivo de ñame dos poblaciones genéticamente distintas de esta especie se encontraron causando antracnosis (Abang *et al.*, 2005). Se investigó la estructura genética de las poblaciones de *C. gloeosporioides* de hospederos con y sin ñame en tres zonas agroecológicas de Nigeria y se observó una alta diversidad genotípica (Abang *et al.*, 2006). Diferentes estudios filogenéticos han confirmado la variabilidad de esta especie. Appiah *et al.* (2016) mediante análisis RAPDs agruparon aislamientos de *C. gloeosporioides* de ñame y yuca en tres grupos principales y seis subgrupos polimórficos relacionados con el hospedero y el origen geográfico.

Datos sobre marcadores de microsatélites y sus niveles de polimorfismo fueron determinados en 95 cepas de *C. gloeosporioides*, en su mayoría aisladas de *Dioscorea alata* y mostraron un número medio de 12,3 alelos polimórficos por locus, indicativo de cantidades dramáticas de polimorfismos raros (Penet *et al.*, 2017). Este tipo de marcadores facilitan los análisis de diversidad genética y los estudios de genética de poblaciones para el complejo de especies. El análisis de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) confirmó la variación genética entre *C. gloeosporioides* y fue eficaz en el establecimiento de relaciones genéticas entre aislados del cultivo de ñame (Aduramigba *et al.*, 2012).

En Colombia se realizó diagnóstico molecular de *C. gloeosporioides* en ñame, utilizando la técnica molecular “DNA Amplification Fingerprinting (DAF), estos estudios mostraron patrones altamente polimórficos entre los aislados de la colección (Pinzón, 2014, Marroquín *et al.*, 2016). La diversidad molecular de esta especie se ha demostrado en aislados patogénicos (Moges *et al.*, 2016) y endófitos (Rabha *et al.*, 2016). Análisis molecular basado en secuencias de los espaciadores transcritos internos de rDNA (ITS1 y ITS2), fueron usados para estudiar la diversidad genética de aislados en Jengibre, Soja, Banano y Mango en Tailandia (Photita *et al.*, 2005). También se encontró variabilidad en Fresa (Osorio *et al.*, 2014), Mango (Mo *et al.*, 2018), Banano (Sabria y Vengadaramana, 2019), Cítricos (Guarnaccia *et al.*, 2017), Aguacate (Sharma, *et al.*, 2017).

Los factores principales involucrados en la diversidad genética en un solo lugar son: variación creada por mutación, recombinación sexual, parasexualidad o debido a la introducción de nuevas cepas en las poblaciones locales (Rodríguez *et al.*, 2013). En el caso del cultivo de ñame, se observó por primera vez el estado sexual en plantas infectadas con antracnosis en Nigeria, lo que indica que la recombinación sexual podría desempeñar un papel importante en las epidemias (Abang *et al.*, 2004; Abang *et al.*, 2006), además, la reproducción sexual puede ocurrir al final de las epidemias, en hojas o tallos muertos que, cuando se dejan en la superficie del suelo, pueden contribuir a la infección primaria del ñame (Ripoche *et al.*, 2007). Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados, donde evidenciamos que algunos aislados produjeron la fase ascogena en hojas y en las colonias crecidas en laboratorio.

La parasexualidad es una forma de variación y de recombinación que se da en los hongos mitosporicos, el uso de la compatibilidad vegetativa y la heterocariosis permite el intercambio génico asexual en *C. gloeosporioides* (Chacko, et al., 1994). En ñame, se comparó la compatibilidad vegetativa, enfrentando aislamientos de diferente origen geográficos, los cuales mostraron compatibilidad en un 90% de los aislados enfrentados (Castro et al., 2003; Abang et al., 2004). Investigando la variabilidad y el comportamiento de cepas de *C. gloeosporioides* en café, se encontró la presencia de cepas sexuales, la formación de CAT (tubos de anastomosis conidial) y alta compatibilidad micelial, sugiriendo la ocurrencia de recombinación sexual y asexual (Pereira et al., 2019). El otro factor que puede favorecer la variabilidad de las cepas, es la introducción de nuevas cepas en las poblaciones locales, la cual puede ocurrir debido a que el fitopatógeno, *C. gloeosporioides* genera infecciones quiescentes en la epidermis del tubérculo de ñame (Green y Simons, 1994), facilitando la dispersión en la semilla de una temporada de cultivo a la siguiente; por lo tanto, los intercambios comerciales de tubérculos, le confieren la capacidad de migración a larga distancia (Green y Simons, 1994; Neema y Frezal, 2018).

La comprensión de la variación genética y el patrón de diversidad de las especies de *Colletotrichum* que afectan los cultivos en un área específica, es un medio importante para definir estrategias de manejo de enfermedades si surge alguna epidemia (Patel et al., 2018). En este sentido, es de vital importancia comprender la diversidad genética y la estructura de la población del hongo, y definir las poblaciones regionales del patógeno para desarrollar e implementar estrategias eficaces de manejo de enfermedades (Moges et al., 2016); lo que mejorará nuestra comprensión de la epidemia de antracnosis y beneficiará el desarrollo de futuras medidas de manejo.

Objetivo 3. Determinar la sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Colletotrichum* spp. en ñame a fungicidas de síntesis química

a) Inhibición del crecimiento micelial

Se observó diferencias significativas en el crecimiento micelial de todos los aislados al ser tratados con las diferentes moléculas de los fungicidas. De los fungicidas evaluados, el azoxystrobin y el captan mostraron mayor efecto sobre el crecimiento micelial de los aislados de *Colletotrichum* con un 75% de inhibición, seguido del clorotalonil y el difenoconazol con valores de 70% y 57%, respectivamente; mancozeb y benomyl presentaron los porcentajes de inhibición más bajos, menores al 50% (figura 11A).

Las cuatro dosis usadas de cada molécula, presentó diferencias significativas entre si, se evidenció una tendencia de mayor inhibición a medida que se incrementó la dosis. La dosis más baja inhibió el crecimiento de los aislados en un 40%, mientras que a dosis altas la inhibición fue superior al 75% (figura 11B). Los aislados presentaron diferencias estadísticas en los crecimientos miceliares, en los diferentes tratamientos con fungicidas

(figura 11C). Tres aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* (DAL5B, DAL6B y DRL4), presentaron alta sensibilidad a los fungicidas, con porcentajes de inhibición superiores al 60%, mientras que el aislado DAL2B fue el menos sensible a los fungicidas con un porcentaje de inhibición inferior al 45%. Por otro lado, dos aislados de *Colletotrichum fructicola* presentaron alta sensibilidad (DAL2A y DRL7) y dos manifestaron baja sensibilidad (DAL5A y DAL6A) a los productos químicos.

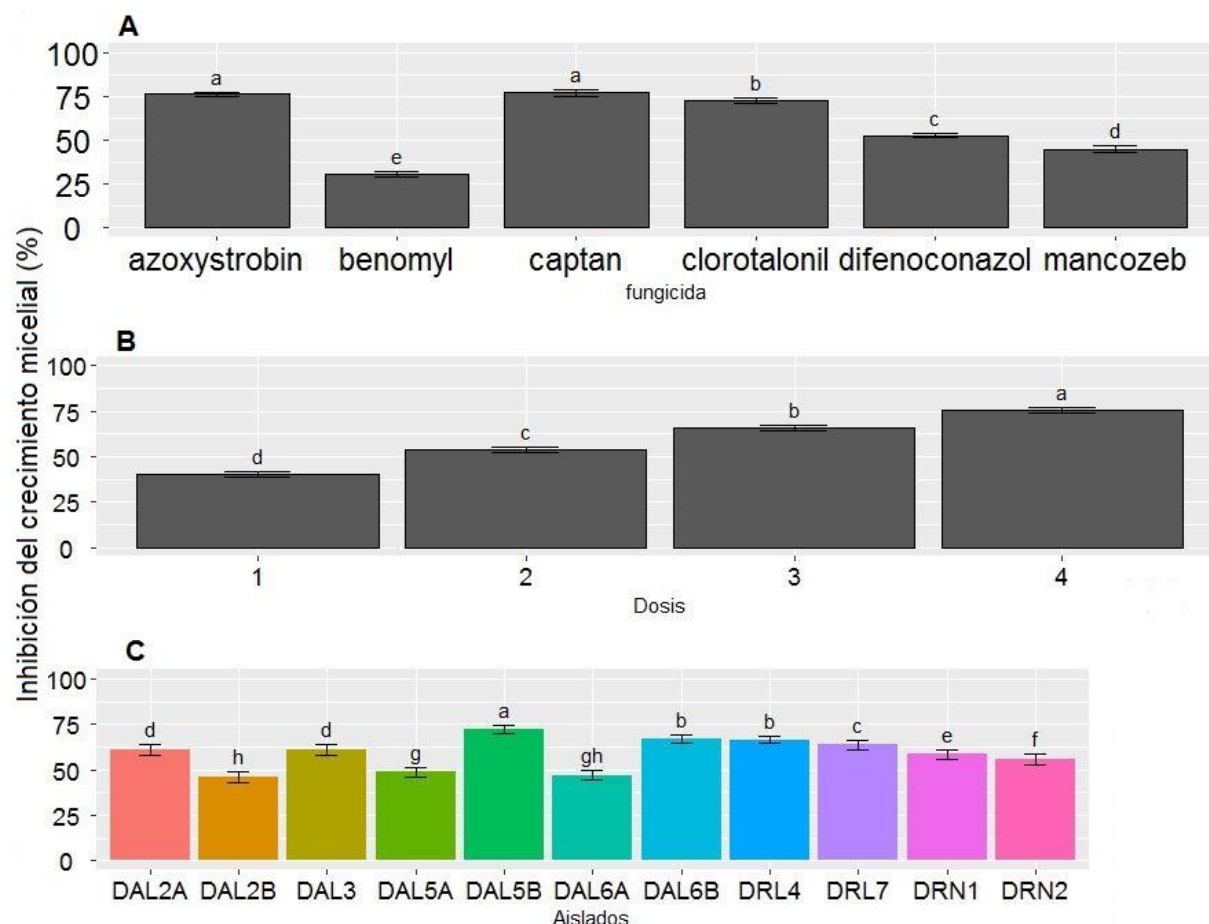


Figura 11. Efectos principales: fungicida, dosis y aislados, sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp.. **A:** Efecto de los fungicidas sobre la inhibición de los aislados, **B:** Efecto de las dosis sobre la inhibición del crecimiento micelial, **C:** Porcentaje de inhibición del crecimiento de aislados sembrados sobre PDA modificado con fungicidas. *C. fructicola* estuvo representado por los aislados DAL2A, DAL5A, DRL6 y DRL7. *C. gloeosporioides* estuvo representado por los aislados DAL3, DRN2, DRL4, DRN1, DAL2B, DAL6B y DAL5B. en la figura 10C. Medias con una letra común son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) según la prueba de comparación múltiple de Tuckey.

Las interacciones mostraron diferencias estadísticas, el efecto de la interacción entre el fungicida y la dosis evaluada fueron significativas (figura 12 y 13), los fungicidas captan y clorotalonil con dosis de 2000 ppm y azoxystrobin con dosis de 10 ppm mostraron una eficacia mayor del 90% en la inhibición del crecimiento de los aislados, sin embargo, los dosis más alta de moléculas como Mancozeb, difenoconazol y benomyl, presentaron baja eficacia contra las cepas del hongo. Los aislados mostraron un efecto negativo en su crecimiento al aplicar incluso las dosis más bajas de los fungicidas, siendo el azoxystrobin con dosis de 1 ppm el que mostró mayor efecto, inhibiendo más del 50% del crecimiento micelial, seguido del captan y clorotalonil al aplicar 500 ppm del producto. La dosis más baja de difenoconazol (1 ppm) también mostró un efecto significativo al compararlo con la aplicación de las dosis bajas de benomyl y mancozeb.

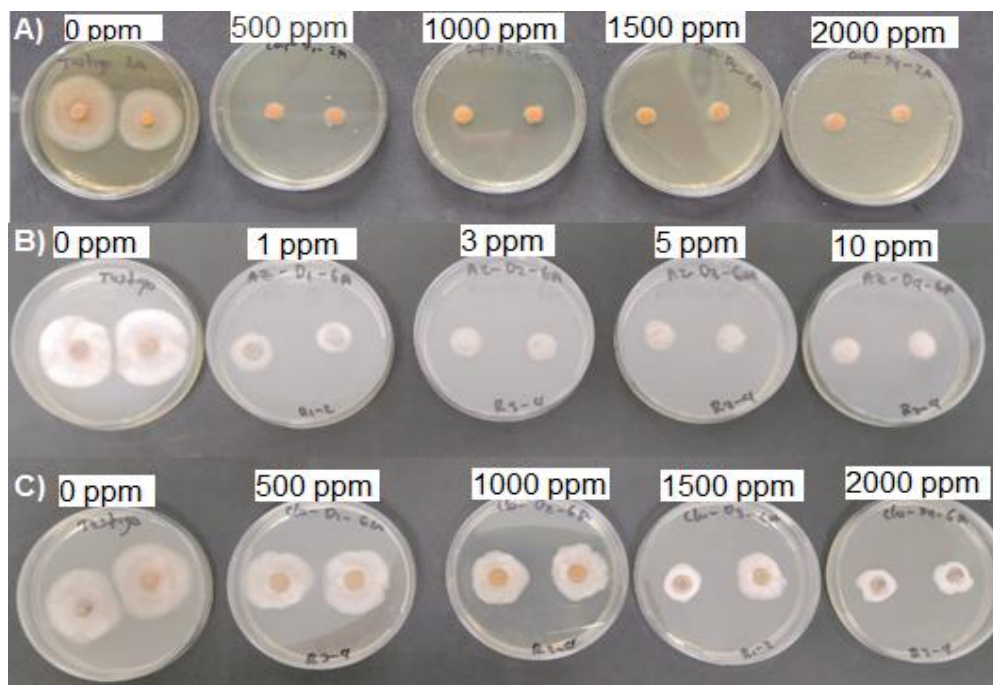


Figura 12. Crecimiento de aislados de *Colletotrichum* sobre PDA modificado con diferentes dosis de fungicidas. En filas horizontales: dosis de fungicidas y sus testigos. **A:** captan, **B:** azoxystrobin, **C:** clorotalonil.

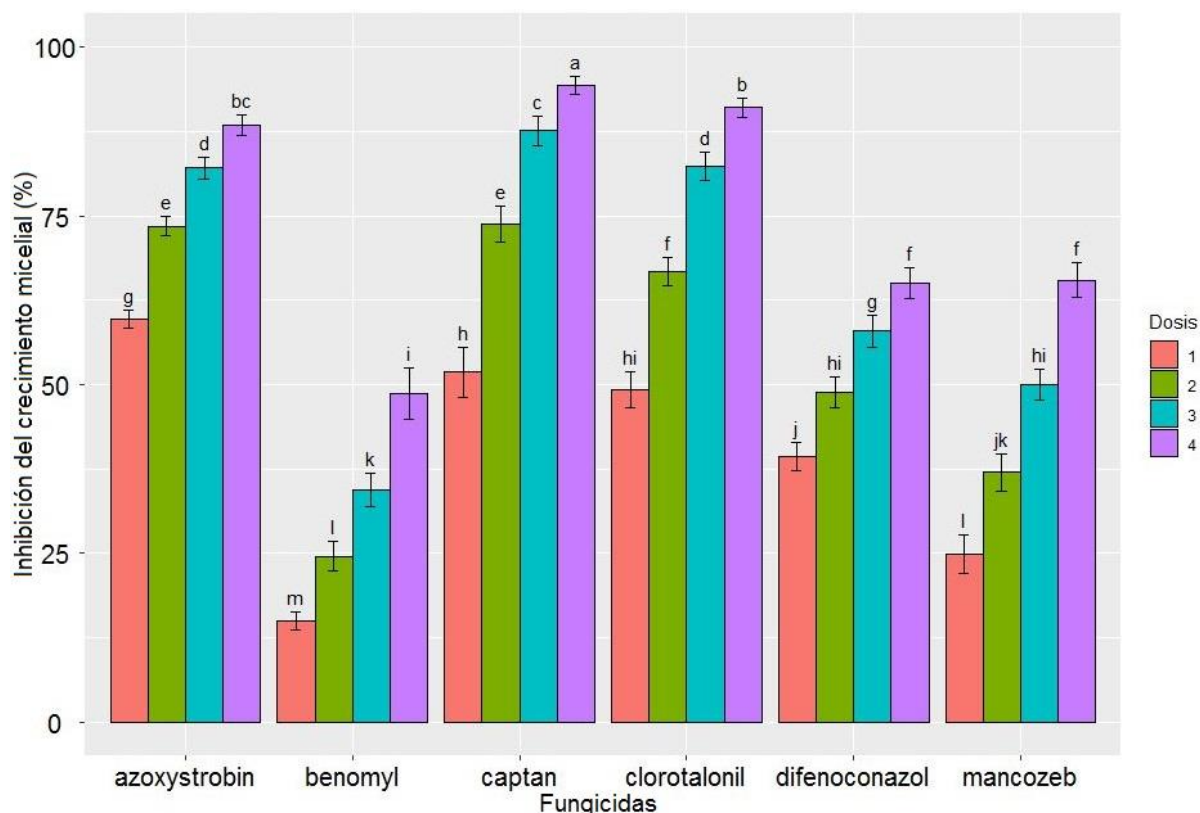


Figura 13. Efecto de la interacción dosis y fungicidas sobre la inhibición del crecimiento micelial de los aislados de *Colletotrichum* spp. (azoxystrobin, benomyl y difenoconazol, dosis 1, 2, 3, 4 = 1, 3, 5, 10 ppm); (captan, clorotalonil y mancozeb, dosis 1, 2, 3, 4 = 500, 1000, 1500, 2000 ppm). Medias con una letra común son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) según la prueba de comparación múltiple de Tuckey.

La interacción entre los fungicida y los aislados evaluados, permitieron inferir que los todos los aislados de *C. gloeosporioides* y *C. fruticola* fueron sensibles a azoxystrobin con porcentajes de inhibición superiores al 70%, siendo el aislado de *C. gloeosporioides* (DRN1) el menos sensible a este producto (figura 14A). En este sentido, las cepas también fueron altamente sensibles al captan (figura 14E), alcanzando porcentajes de inhibición cercanos al 100%, como se observó en los aislados DAL2A, DAL5A y DAL6A. No obstante, cuatro cepas de *C. gloeosporioides* (DRL4, DRN1, DAL2B y DAL3), presentaron los porcentajes de inhibición más bajos a este fungicida. Los aislados también mostraron alta sensibilidad al clorotalonil y sensibilidades intermedias al difenoconazol y Mancozeb, como fue el caso del aislado DRN2, mientras que la mayoría de los aislados presentaron baja sensibilidad al benomyl, con porcentajes de inhibición inferiores al 25%, con excepción del DAL5A que mostró mayor sensibilidad a este producto.

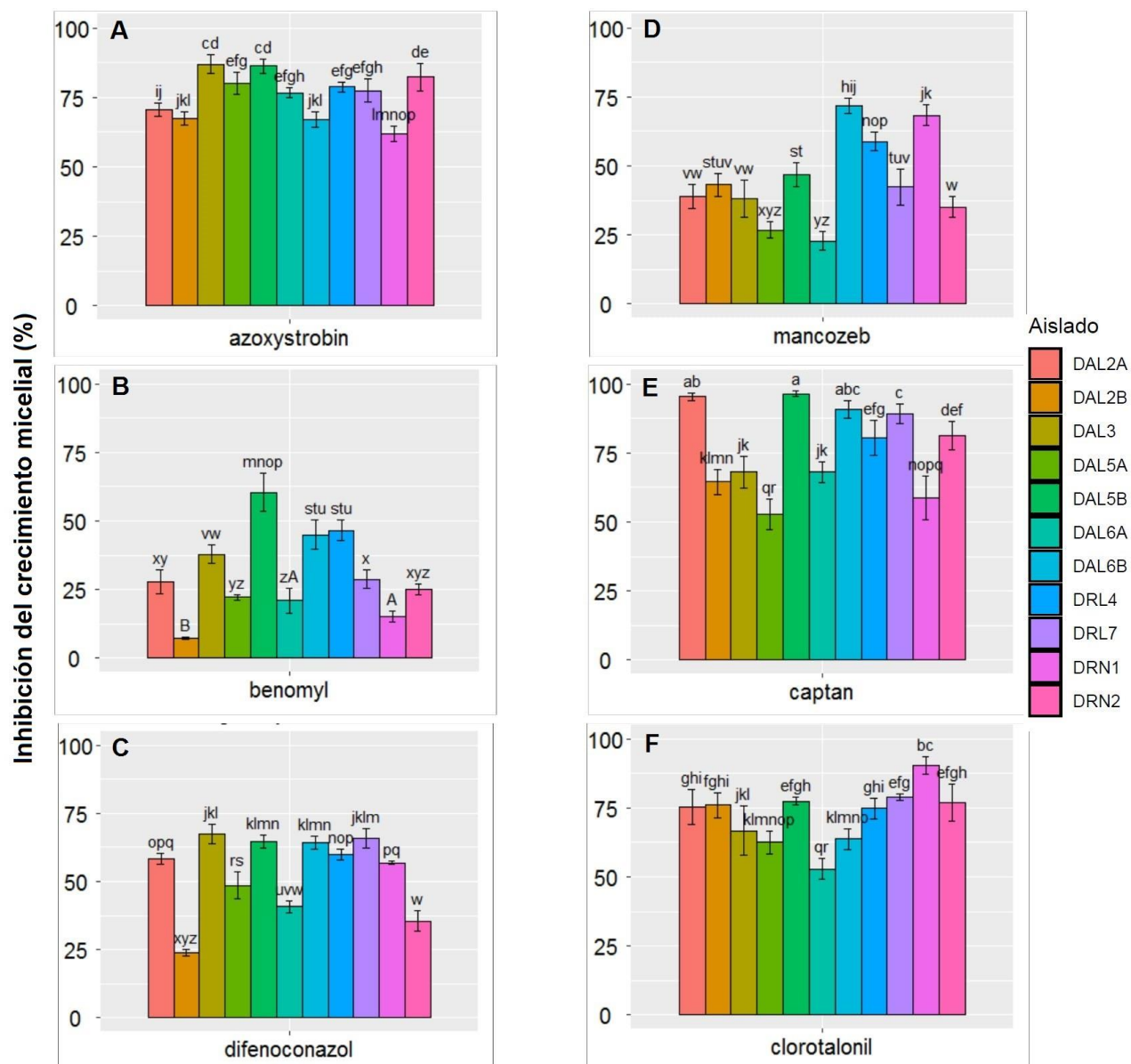


Figura 14. Efecto de la interacción entre fungicidas y aislados sobre la inhibición del crecimiento micelial. **A:** azoxystrobin. **B:** benomyl. **C:** difenoconazol. **D:** mancozeb. **E:** captan. **F:** clorotalonil. *C. fruticola* estuvo representado por los aislados DAL2A, DAL5A, DRL6 y DRL7. *C. gloeosporioides* estuvo representado por los aislados DAL3, DRN2, DRL4, DRN1, DAL2B, DAL6B y DAL5B. Medias con una letra común son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) según la prueba de comparación múltiple de Tuckey.

La interacción entre la dosis aplicada y el aislado mostró diferencias significativas, se evidenció que la inhibición del crecimiento micelial fue directamente proporcional a la dosis aplicada. Siendo las dosis más altas la más eficaz en la mayoría de los aislados, mostrando porcentajes de inhibición superiores al 75%, con algunas excepciones, como se observó en los aislados DAL2B, DRL4 y DAL5B, los cuales presentaron sensibilidades más reducidas a los fungicidas evaluados. El comportamiento de estos aislados se presentó de manera similar al compararlos con la aplicación de las dosis más bajas. El aislado DAL5A fue el más sensible tanto a dosis bajas como a dosis altas, mientras que el más resistente a todas las dosis fue el aislado DAL2B (Figura 15).

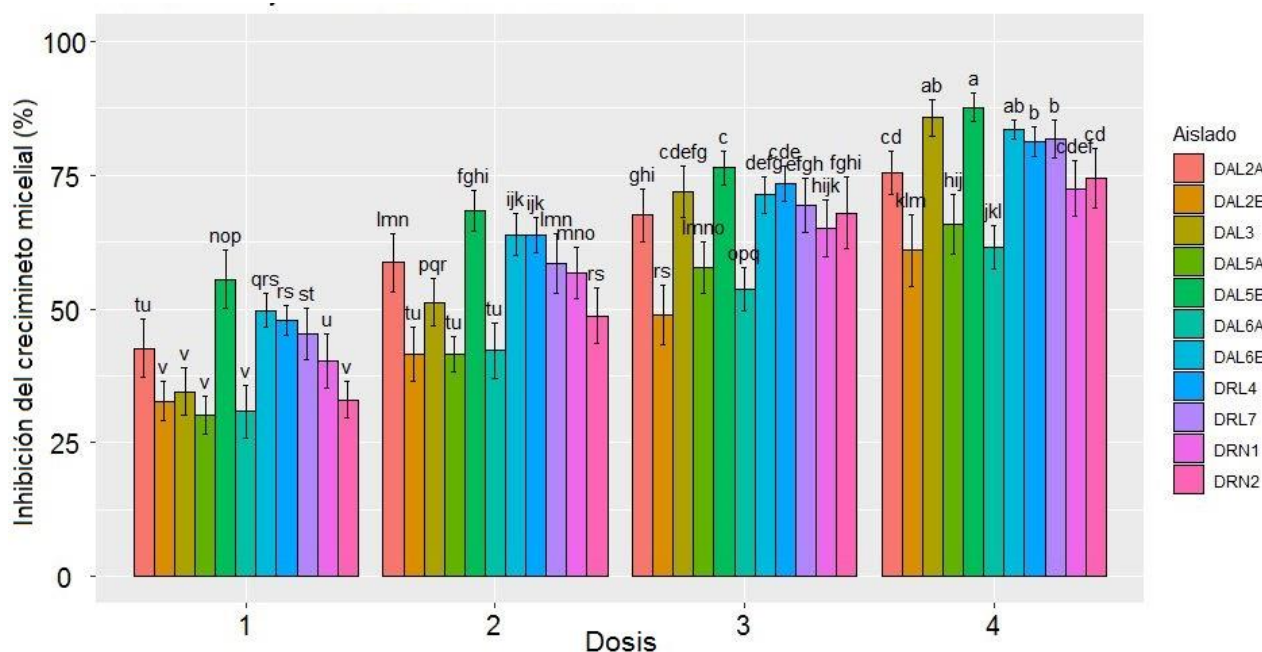


Figura 15. Efecto de la interacción dosis y aislados de *Colletotrichum* spp. sobre la inhibición del crecimiento micelial. (azoxystrobin, benomyl y difenoconazol, dosis 1, 2, 3, 4 = 1, 3, 5, 10 ppm); (captan, clorotalonil y mancozeb, dosis 1, 2, 3, 4 = 500, 1000, 1500, 2000 ppm). *C. fructicola* estuvo representado por los aislados DAL2A, DAL5A, DRL6 y DRL7. *C. gloeosporioides* estuvo representado por los aislados DAL3, DRN2, DRL4, DRN1, DAL2B, DAL6B y DAL5B. Medias con una letra común son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) según la prueba de comparación múltiple de Tuckey.

La sensibilidad de los aislamientos también se determinó con los valores de la DL₅₀ (tabla 10). Estos indicaron que todos los aislados de *C. gloeosporioides* y *C. fructicola* fueron sensibles al azoxystrobin con valores desde 0,2 a 1,3 ppm y DL₅₀ medios de 0,7 y 0,5 ppm, respectivamente (tabla 10). Dos de los aislamientos de *C. gloeosporioides* fueron altamente resistentes al benomyl (DL₅₀ valores >100 ppm) y uno presentó resistencia intermedia a este producto con un valor de DL₅₀ de 36,7 ppm, el resto de las cepas mostraron alta sensibilidad, mientras que todos los aislados de *C. fructicola* mostraron resistencia intermedia y alta resistencia al benomyl. Los aislados de *C. gloeosporioides* fueron altamente sensibles al difenoconazol, con excepción del aislado DAL2B que presentó un valor de DL₅₀ de 239,4 ppm, clasificado entonces como altamente resistente. No obstante, todos los aislados de *C. fructicola* fueron sensibles al difenoconazol (DL₅₀ medio de 3,83 ppm).

Para los fungicidas multisitios se tomó como referencia la dosis discriminadora de 1000 ppm, propuesta por Moreira *et al.*, (2019). Con estos datos evidenciamos que los aislados de *C. gloeosporioides* y *C. fructicola* presentaron baja sensibilidad a Mancozeb, con valores de DL₅₀ medios de 1151,6 y 2200,3 ppm respectivamente. El captan mostró eficacia inhibiendo el crecimiento micelial de las cepas de *C. gloeosporioides* y *C. fructicola* con valores de DL₅₀ por debajo de la dosis discriminadora, con excepción de las cepas DAL2B y DAL5A (DL₅₀ de 1803 y 1052,2 ppm), respectivamente. Solo un aislado de *C. gloeosporioides* presentó baja sensibilidad al clorotalonil (DL₅₀ de 1013,1ppm), el resto de los aislados fueron sensibles a este producto, con DL₅₀ medios de 714,1 ppm, mientras que las cuatro cepas de *C. fructicola* fueron sensibles al fungicida.

Según los valores de DL₅₀, el azoxystrobin y el difenoconazol fueron más efectivos contra los aislados de *Colletotrichum* utilizado en este estudio, seguidos por el clorotalonil y el captan, mientras que los fungicidas menos eficaces fueron el mancozeb y el benomyl.

Las investigaciones han permitido identificar diferentes mecanismos involucrados en la resistencia a los fungicidas (Lucas *et al.*, 2015), entre ellos se encuentran: (i) alteración del sitio objetivo: las mutaciones que ocurren en forma natural o inducida, dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos del sitio objetivo, lo que a su vez altera la forma del sitio de bloqueo/objetivo, provocando que el fungicida ya no encaje en el sitio destino; reduciendo la sensibilidad del fungicida, debido a la disminución en la tasa de ingreso del fungicida a las células del patógeno (Brent y Hollomon, 1995; FRAC, 2022); (ii) desintoxicación o metabolismo del fungicida: la célula fúngica contiene una amplia gama de maquinaria metabólica que puede modificar el fungicida a una forma no tóxica, proceso que se da en tres fases: fase I (citocromo P450, proteínas del citocromo P [CYP] y monooxigenasas) catalizan xenobióticos y endobióticos principalmente a través de reacciones de hidroxilación/oxidación; fase II, las enzimas de conjugación de (UDP-glucuronosiltransferasa, sulfotransferasa y glutatión S -transferasa) agregan moléculas polares a los compuestos, produciendo metabolitos no tóxicos solubles en

agua, y el sistema de secreción de fase III, que consiste en un casete de unión a ATP (ABC) y otros transportadores transmembrana que exportan activamente a través de la membrana citoplasmática (Sang *et al.*, 2018; Sánchez, 2021; Hu y Chen, 2021); (iii) sobreexpresión del objetivo: la producción de enzimas adicionales en el sitio diana puede aumentar la probabilidad de que una cantidad suficiente del sustrato fúngico pueda unirse a su objetivo, sin que se cierren los procesos celulares críticos (Brent y Hollomon, 1995; FRAC, 2022); (iv) exclusión o expulsión del sitio de destino: en todos los organismos vivos, existen bombas de expulsión, las cuales son proteínas integrales unidas a la membrana que transportan una amplia gama de sustancias extrañas o exportar sustancias endógenas, como fungicidas, a través de una membrana biológica (Sánchez, 2021). En los hongos, las bombas de eflujo más comunes son los transportadores de cassette de unión a ATP (ABC) y los transportadores de la superfamilia de facilitadores principales (MFS), ocasionalmente, estos transportadores tienen éxito en expulsar suficiente fungicida de modo que un aislado tenga sensibilidad reducida (FRAC, 2022). La aplicación de los fungicidas en cuestión puede ejercer suficiente presión de selección como para que los aislamientos que contienen estos transportadores exportadores de fungicidas se vuelvan más prevalentes en la población (Hu y Chen, 2021).

Tabla 10. Valores de la dosis letal al 50% (DL₅₀) de seis fungicidas sobre la supresión del crecimiento micelial de aislados de *Colletotrichum*.

DL ₅₀ (ppm de ingrediente activo)						
Fungicida	Azoxystrobin	Benomyl	Difenoconazol	Mancozeb	Captan	Clorotalonil
Aislado						
<i>C. gloeosporioides</i>	0,80	4003,60	239,40	1803,90	1803,90	489,90
<i>C. gloeosporioides</i>	0,60	7,60	1,00	1493,10	704,10	1013,10
<i>C. gloeosporioides</i>	0,20	4,40	1,00	731,90	576,60	417,70
<i>C. gloeosporioides</i>	0,40	2,60	0,90	1253,30	90,80	58,10
<i>C. gloeosporioides</i>	0,80	4,70	0,80	395,90	377,10	666,70
<i>C. gloeosporioides</i>	1,30	221,50	0,10	530,10	936,90	341,50
<i>C. gloeosporioides</i>	0,90	36,70	8,40	1853,40	509,50	628,00
<i>C. fructicola</i>	0,40	9,70	1,20	1558,20	90,40	622,30
<i>C. fructicola</i>	0,70	2644,50	3,80	2979,20	1052,20	731,60
<i>C. fructicola</i>	0,20	11,30	9,00	2807,90	557,80	997,90
<i>C. fructicola</i>	0,90	11,90	1,30	1456,00	383,70	58,10
Promedio	0,65	632,59	24,26	1532,99	643,91	547,72

Azoxystrobin mostró ser eficaz contra todos los aislados evaluados, esta molécula hace parte de los fungicidas inhibidores de la respiración (RI), como los inhibidores de quinona externa (QoI) (Sierotzki, 2015). Uno de los grupos más comunes dentro de la QoI son los fungicidas de estrobilurina, y el ingrediente activo (ia), azoxystrobin se ha utilizado en diferentes cultivos para el manejo de la antracnosis (Bartlett *et al.*, 2002). Los fungicidas QoI inhiben la respiración mitocondrial de los hongos al unirse al complejo enzimático del citocromo *bc1* (complejo III) en el sitio Qo, bloqueando la transferencia de electrones y deteniendo la síntesis de ATP (Wei *et al.*, 2021). El Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas lo clasificó como grupo de código 11 y presenta un alto riesgo de desarrollo de resistencia (FRAC, 2021). El mal uso de este fungicida puede conducir a la selección de aislamientos resistentes, siendo la alteración del sitio objetivo, el mecanismo más común que genera la resistencia a este grupo químico. Las investigaciones han demostrado que una mutación puntual del sitio bioquímico diana G143A, es el mecanismo principal; también las alteraciones de F129L y G137R pueden causar resistencia, pero con menor relevancia (Sierotzki, 2015; Dixon *et al.*, 2020). La caracterización molecular del gen *Cyt b* reveló que la mutación puntual G143A fue el determinante de la alta resistencia de *Colletotrichum fructicola* a azoxystrobin en Melocotón, en China (Usman *et al.*, 2021). Ya se ha informado de resistencia a azoxystrobin en muchos patógenos como *Colletotrichum* spp. en ñame (Arce *et al.*, 2019), en fresa (Luo *et al.*, 2020), *Cercospora nicotianae* en tabaco (Dixon *et al.*, 2020), *Colletotrichum siamense* en arandano (Hu *et al.*, 2015), *Monilinia fructicola* en melocotón (Chen *et al.*, 2014), *Colletotrichum gloeosporioides* y *Plasmopara viticola* en uva (Wei *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2020).

Un estudio sobre los perfiles de resistencia a azoxystrobin en aislados de *Colletotrichum* de manzanas, evidenció que la resistencia ha surgido y se está seleccionando en los huertos mediante las estrategias de fumigación actuales, la cual ha provocado mutaciones puntuales de G143A en el citocromo *b* (CYTB) como resultado de una alta presión de selección ejercida por la molécula química, además, un aislado resistente no poseía variación de aminoácidos en CYTB (Chechi *et al.*, 2019). Esta última condición, también fue encontrada cuando se observó que la sensibilidad reducida a azoxystrobin en *Lasiodiplodia theobromae* de papaya, la cual no fue atribuible a alteraciones del gen *Cytb* (Chen *et al.*, 2020). Lo anterior, sugiere que los patógenos causantes de enfermedades en plantas, pueden tener diferentes mecanismos involucrados en la resistencia a fungicidas basados en azoxystrobin. Por ejemplo, se encontró que el transportador de fármacos MgMfs1 es un determinante de la sensibilidad a la estrobilurina de las cepas de campo de *Mycosphaerella graminicola* (Roohparvar *et al.*, 2008). La plasticidad del promotor *MFS1* conduce a la resistencia a múltiples fármacos en el patógeno del trigo *Zymoseptoria tritici* (Omrane *et al.*, 2017). Un ensayo demostró que el transportador de flujo ABC *CaABC1* de *Colletotrichum acutatum*, es necesario para tolerar la exposición a fungicidas QoI en *Capsicum annum* L (Kim *et al.*, 2014). La degradación del pesticida debido a la desintoxicación por enzimas metabólicas como el citocromo P450 o la glutatión transferasa se ha reportado en el fungicida QoI kresoxim-metil a través de la actividad esterasa (Jabs *et al.*, 2001).

La resistencia está muy extendida en muchos patógenos vegetales y ha evolucionado con bastante rapidez en los sistemas patógeno/hospedador de alto riesgo (Sierotzki, 2015), sin embargo, ésta se ha desarrollado con menos rapidez en patógenos donde se ha inhibido el crecimiento micelial con dosis menores a 10 ppm como *Magnaporthe oryzae* en arroz (Kunova *et al.*, 2014) *Guignardia citricarpa* en cítricos (Hincapie *et al.*, 2014) y en especies de *Colletotrichum* en arándanos cultivados en Massachusetts, donde los aislados tuvieron una inhibición del crecimiento micelial del 50 al 60% a 1 ppm (Giorgio *et al.*, 2020), resultados que fueron similares a los nuestros. Ensayos contrastantes con los datos encontrados en esta investigación, fueron el resultado de estudiar la sensibilidad basal de aislados de *Colletotrichum acutatum* de campos de fresas en Brasil, donde los aislados mostraron valores de DL_{50} desde 0,07 a 4,16 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Baggio *et al.*, 2018), igualmente en México la sensibilidad a azoxystrobin de los aislados de *C. acutatum* obtenidos de fresa, la DL_{50} osciló entre 0,04 y 0,36 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Espinoza *et al.*, 2017).

Los aislados mostraron alta sensibilidad al difenoconazol, este hace parte de los fungicidas inhibidores de la desmetilación de esterol (DMI), comprenden un importante grupo de compuestos de éxito comercial, pertenecientes a diferentes clases químicas como triazoles, imidazoles, piperazinas, pirimidinas y piridinas (Ziogas y Malandraki, 2015). Los derivados del triazol como el difenoconazol, han sido la química fundamental utilizada por los productores para controlar las enfermedades de los cultivos (King *et al.*, 2021), porque detienen el crecimiento de hongos durante y después de la infección al inhibir la desmetilación en la Carbono 14- α del lanosterol, un esterol intermedio del ergosterol, que es esencial para el crecimiento de las hifas (Villani *et al.*, 2015).

Los fungicidas DMI, a pesar de su extenso uso para controlar una amplia gama de patógenos de las plantas durante las últimas cuatro décadas y a pesar de su modo de acción sitio-específico, que generalmente favorece el desarrollo de la resistencia, todavía conservan la mayor parte de su eficacia (Ziogas y Malandraki, 2015); esto se evidencia en este ensayo, donde encontramos que los aislados de *Colletotrichum* que causan la antracnosis del ñame, fueron sensibles a este fungicida. Resultados similares fueron encontrados en trabajos realizados sobre la sensibilidad de especies de *Colletotrichum* de melocotón a fungicidas inhibidores de la desmetilación evidenciaron que *C. fruticola* y *C. siamense* fueron sensibles al difenoconazol (DL_{50} valores de 0,2 a 13,1 $\text{g}.\text{ml}^{-1}$) (Chen *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2020). En ensayos de crecimiento micelial, difenoconazol también fue eficaz contra complejos de *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* en cítricos, con medias de DL_{50} de 0,14 $\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Gama *et al.*, 2020). Las cepas de *C. fruticola* aislados de fresa, fueron más sensibles al difenoconazol que los aislados de *C. siamense*, cuyos valores de DL_{50} fueron 0,036 y 0,056 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, respectivamente (Zhang *et al.*, 2020). En general, los fungicidas inhibidores de la desmetilación (DMI) fueron la mejor opción entre los diferentes productos químicos para manejar la antracnosis del melocotón en China (Usman *et al.*, 2021).

Otros patógenos de plantas como *Aspergillus uvarum* en uva (Cosseboom y Hu, 2021), *Bipolaris sorokiniana* en trigo (Wei *et al.*, 2021) y *Penicillium spp* (Jurick *et al.*, 2019), mostraron ser altamente sensibles al difenoconazol. Diferentes estudios muestran que algunos patógenos presentan una sensibilidad diferencial al difenoconazol y que los mecanismos potenciales de resistencia a este fungicida implican mutaciones puntuales dentro del sitio de reconocimiento del sustrato de los genes del inhibidor de la desmetilación P450 (CYP51), sobreexpresión de genes CYP51 (Villani *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021), reducción de la acumulación de DMI en las células fúngicas a través de la regulación al alza de los transportadores de cassette de unión a ATP (ABC) o superfamilia de facilitadores principales (MFS) en la membrana (Hulvey *et al.*, 2012; Omrane *et al.*, 2015; Omrane *et al.*, 2017; Samaras *et al.*, 2020) o debido a la desintoxicación por el citocromo P450 monooxigenasa Cyp684 (Azeddine *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2017)

Este estudio indica que los patógenos que causan la antracnosis en el ñame muestran resistencia al benomil, este hace parte del grupo químico de los benzimidazoles, los cuales se introdujeron por primera vez a finales de la década de 1960 como fungicidas sistémicos muy eficaces (Young, 2015), ya que actúan como inhibidores del ensamblaje de β -tubulina en la mitosis y causar una germinación anormal de las esporas y elongación del tubo germinativo, y afectar negativamente el crecimiento de hongos sensibles (Ramdial *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016). Los derivados de benzimidazol juegan un papel importante en el control de varios patógenos fúngicos, entre los más populares tenemos al carbendazim, benomil y tiabendazol (Young, 2015; Zhou *et al.*, 2016). Los estudios de laboratorio de mutantes resistentes han demostrado que mutaciones en la β -tubulina eran capaces de conferir resistencia a los benzimidazoles. Como fue el caso de *Colletotrichum* que causa antracnosis en el cultivo de ñame en china, donde los aislados altamente resistentes al carbendazin albergaban la mutación E198A en el gen de la β tubulina 2 (TUB2), mientras que los aislados moderadamente resistentes al carbendazin albergaban la mutación F200Y en el gen TUB2 (Han *et al.*, 2018). En el caso del benomil, igualmente se han reportado casos de resistencia mediante el uso de dosis discriminatoria de 10 ppm por diferentes especies de *Colletotrichum* como *C. truncatum* en pimentón (Ramdial *et al.*, 2016), *C. gloeosporioides* en *Limonium spp.* (Maymon *et al.*, 2006) y *C. cereale* en pastos (Wong *et al.*, 2008), resultados que fueron similares con los encontrados en este ensayo.

No conocemos los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a benomil en las especies de *Colletotrichum* en ñame, pero podemos inferir que se deben a las mutaciones E198A/G/K/Q y F200Y, ya que son las más frecuentes (Poti *et al.*, 2020; Martin *et al.*, 2021). No obstante, existen otros mecanismos que pueden explicar la baja sensibilidad a este producto químico, por ejemplo, se ha descrito que los factores genéticos subyacentes a la sobreexpresión de las bombas de eflujo están involucrados en la sensibilidad reducida al benomil en *Colletotrichum acutatum* (Nakaune *et al.*, 2007). Además, en *Mycobacterium sp.* se encontró un gen de hidrolasa que era capaz de degradar (desintoxicar) el fungicida carbendazin (MBC) (Zhang *et al.*, 2017).

En muchos casos, se ha demostrado que los mutantes resistentes persisten en la población durante muchos años, incluso después de que se haya suspendido el uso de benzimidazol (Luo *et al.*, 2020).

Los fungicidas de contacto inhibieron el crecimiento micelial de los aislados, algunos con mayor porcentaje como el captan y clorotalonil y otros con menos porcentaje como el mancozeb. Estos compuestos son tóxicos para los conidios, ya que bloquean varias enzimas que contienen tiol y que participan en la descomposición de las moléculas de reserva y en la respiración celular (Schnabel *et al.*, 2015). Captan y clorotalonil pueden inhibir simultáneamente muchas enzimas y coenzimas, particularmente las que contienen grupos sulfidrilicos, afectando inespecíficamente un gran grupo de procesos metabólicos (Ghini y Kamati, 2000; Gullino *et al.*, 2010).

Resultados similares a los de esta investigación fueron encontrados en un estudio reciente, donde determinaron la sensibilidad del complejo de especies *Colletotrichum acutatum* de los manzanos en Brasil a diferentes fungicidas, empleando una dosis discriminatoria para mancozeb de 1000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ y las frecuencias en la sensibilidad de los aislamientos fueron 25% de alta resistencia, 50% de baja resistencia y 25% de sensibilidad intermedia (Moreira *et al.*, 2019). Investigaciones sobre el manejo de la antracnosis de chile causada por *Colletotrichum capsici* en condiciones *in vitro* arroja que el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se presentó al aplicar una concentración de 2500 ppm de mancozeb (Katediya *et al.*, 2019). La sensibilidad *in vitro* de aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* en cultivos de granada, marañón y banano mostraron porcentajes de inhibición que oscilaron entre el 50 y el 100% aplicando dosis entre 1000 y 2000 ppm de mancozeb, captan y clorotalonil (Jagtap *et al.*, 2015; Dhavale *et al.*, 2019; Patrice *et al.*, 2021). El fitopatógeno *C. gloeosporioides*, causante de la antracnosis en la uva mostró un grado de eficacia diferencial para cuatro fungicidas evaluados *in vitro* y sus efectos fueron directamente proporcionales a la dosis utilizada, siendo el clorotalonil uno de los más eficaces inhibiendo el crecimiento micelial del hongo (López y Castaño, 2020). El captan logró reducir totalmente el crecimiento de la colonia de *C. acutatum* agente causal de la antracnosis y caída prematura de los frutos del naranjo (Guillén *et al.*, 2017). Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en esta investigación. De igual forma, los fungicidas multisitio como captan, mancozeb y clorotalonil han servido de base para los programas de fungicidas para el manejo de enfermedades en diferentes cultivos (Gullino *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2020; Anastassiadou *et al.*, 2020; Xavier *et al.*, 2020).

A diferencia de los fungicidas sistémicos, los fungicidas multisitio permanecen en la superficie de la planta, impidiendo la germinación de las conidias y ascosporas (Schnabel *et al.*, 2015). Este tipo de fungicidas puede ser eliminado por la lluvia con bastante facilidad y no presenta ninguna protección contra los patógenos en las hojas nuevas. Por lo tanto, el tratamiento tiene que repetirse muy a menudo para garantizar la protección (Cox, 2015).

Por otro lado, a cambio de su modo de acción inespecífico, estos fungicidas no causan problemas de resistencia en los patógenos, y la aplicación de estos agentes no está restringida por las directrices de gestión de la resistencia (Mehl y Manger, 2015; FRAC, 2018). No hay limitaciones ni restricciones en cuanto al número de aplicaciones, el momento o la secuencia, siempre y cuando estén dentro de los límites de las etiquetas del fabricante (FRAC, 2018). No obstante, sólo se han registrado unos pocos casos de resistencia práctica en plantas ornamentales y hortalizas (Cox, 2015). Se ha sugerido que su reacción con componentes tiólicos no esenciales, como el glutatión en particular, conduce a la desintoxicación de varios tóxicos multisitio (Leroux *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2021). Muchas especies del género *Colletotrichum* presentan baja sensibilidad a mancozeb, debido a que este patógeno tiene la capacidad de inactivar la molécula fungicida por sobreproducción de tioles (Ferreira *et al.*, 2009; Gullino *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2019). Para fungicidas multisitio como el captan, se ha sugerido la reacción con derivados de tiol no esenciales (enzimas de fase II) como un posible mecanismo para la desintoxicación (Barak y Edgington, 1984). Más recientemente, Sang *et al.* (2018) informaron que la sobreexpresión del citocromo P450 de fase I y ABC de fase III estaba regulada por una mutación de ganancia de función del factor de transcripción ShXDR1 en aislamientos resistentes de *Sclerotinia homoeocarpa*.

b) Inhibición de la germinación

La germinación de las conidias, tomadas como el valor de la absorbancia a 450 nm de los aislados de *Colletotrichum*, se vio afectada significativamente con la aplicación de los fungicidas. El aislado DRN2 fue el menos sensible a los fungicidas evaluados, presentando diferencias significativas con respecto a las demás cepas del patógeno. Cuatro de los once aislados se comportaron estadísticamente iguales (DRN1, DAL5A, DAL5B y DAL2B), observándose en ellos baja sensibilidad en cuanto a la germinación de las conidias. A todos estos, les siguió la cepa DAL2A, la cual presentó sensibilidad intermedia, mientras que el resto de los aislados no presentó diferencias estadísticas, siendo DAL3 el más sensible a los fungicidas (Figura 16).

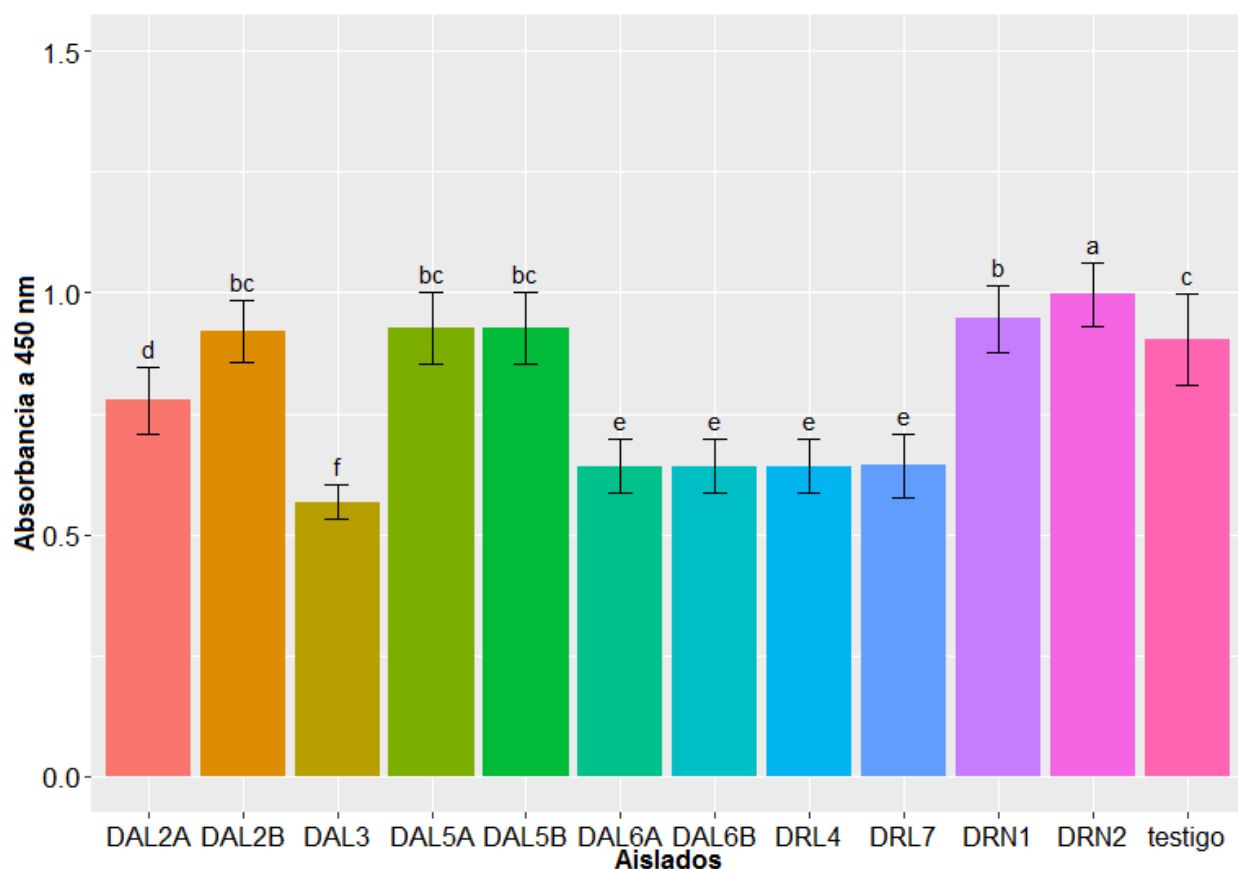


Figura 16. Efecto de fungicidas sobre la germinación de conidias de *Colletotrichum* spp. usando el valor de absorbancia a 450nm. *C. fructicola* estuvo representado por los aislados DAL2A, DAL5A, DRL6 y DRL7. *C. gloeosporioides* estuvo representado por los aislados DAL3, DRN2, DRL4, DRN1, DAL2B, DAL6B y DAL5B. Medias con una letra común son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) según la prueba de comparación múltiple de Tuckey.

La interacción entre el fungicida y los aislados de *Colletotrichum* spp., mostraron diferencias altamente significativas (figura 17). Azoxystrobin inhibió la germinación de seis aislamientos, mientras que cinco cepas presentaron baja sensibilidad a este fungicida. El producto químico benomyl no fue eficaz inhibiendo la germinación de las conidias de *Colletotrichum*, los valor de absorbancia indican que los 11 aislamientos fueron resistentes a esta molécula. Difenconazol evidenció un efecto negativo sobre la germinación de las conidias, cinco aislamientos mostraron baja sensibilidad al fungicida. Los productos de contacto presentaron mejores efectos sobre la germinación de la conidias que los fungicidas sistémicos. Seis de los aislados evaluados mostraron menos sensibilidad al mancozeb, cuatro al captan, y dos al clorotalonil, sin embargo todos estos estuvieron por debajo del testigo. Las cepas DRN2, DRN1, DAL5A, DAL5B, DAL2B y

DAL2A, fueron las más resistentes a los fungicidas. El aislado DAL3 fue el más sensible a fungicidas a base de mancozeb, captan y difenoconazol, mientras que DRL7 fue el más sensible a azoxystrobin, benomyl y clorotalonil.

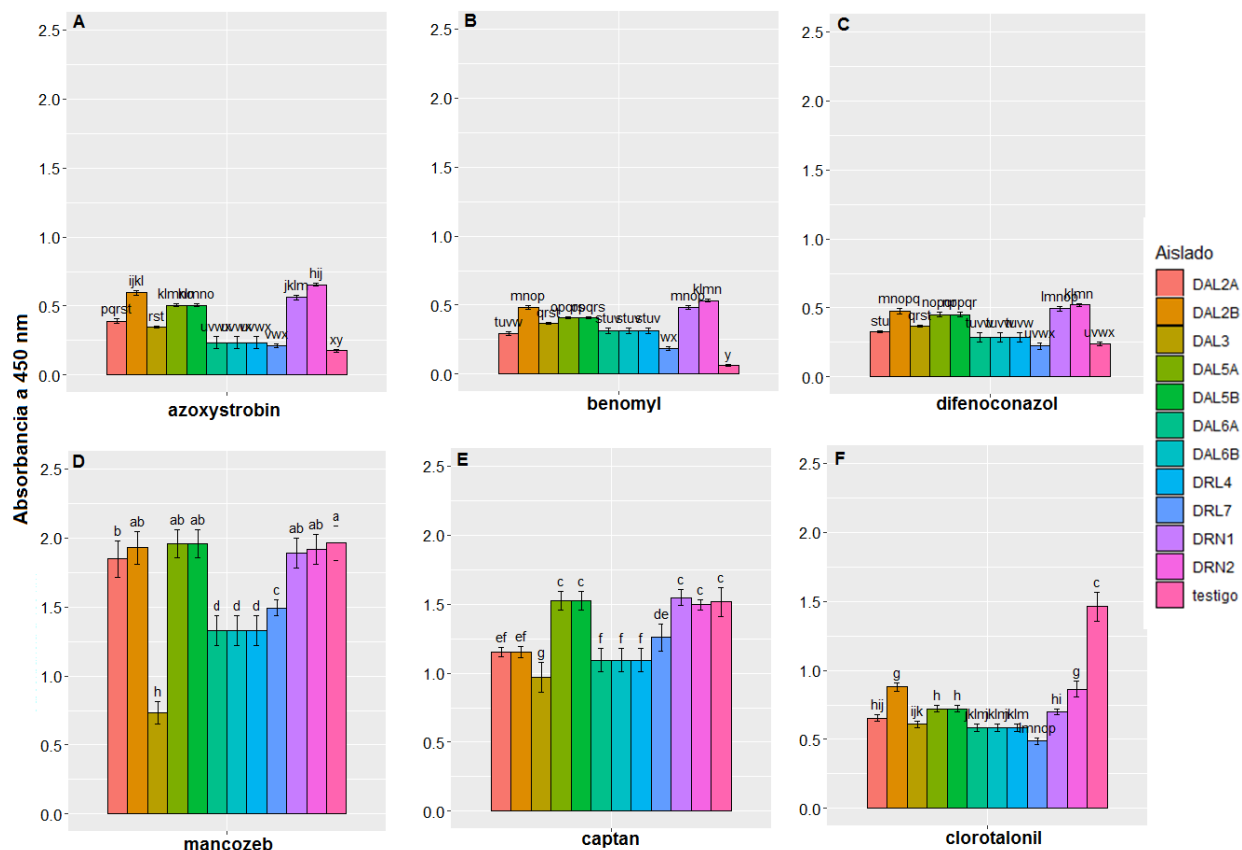


Figura 17. Efecto de la interacción entre el fungicida y aislado sobre la germinación de *Colletotrichum* spp. usando el valor de absorbancia a 450nm. **A:** azoxystrobin. **B:** benomyl. **C:** difenoconazol. **D:** mancozeb. **E:** captan. **F:** clorotalonil. *C. fructicola* estuvo representado por los aislados DAL2A, DAL5A, DRL6 y DRL7. *C. gloeosporioides* estuvo representado por los aislados DAL3, DRN2, DRL4, DRN1, DAL2B, DAL6B y DAL5B. Medias con una letra común son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) según la prueba de comparación múltiple de Tuckey.

El efecto de los fungicidas sobre la germinación de las conidias de los aislados de *Colletotrichum* no se manifiesta de manera similar con respecto a la inhibición del crecimiento micelial, puesto que estos dos fenómenos son procesos vitales del hongo completamente diferentes entre sí (Osorio, 1989). No obstante, se presentan algunas similitudes, por ejemplo, los fungicidas de contacto captan y clorotalonil fueron los más eficaces inhibiendo la germinación de las conidias en comparación con el Mancozeb, mientras que los fungicidas sistémicos azoxystrobin, benomyl y difenoconazol se comportaron de manera similar y tuvieron un efecto más bajo en la inhibición de la germinación. Esta situación se ha observado en diferentes estudios, donde se reveló que la azoxistrobina no inhibió la germinación de las esporas de *C. acutatum* a concentraciones de hasta 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Forcelini *et al.*, 2016). Los experimentos *in vitro* sobre aislados de *Colletotrichum acutatum* en Ají mostraron que la azoxistrobina inhibían tanto el crecimiento del micelio como la germinación de las esporas, mientras que el mancozeb solo era eficaz para inhibir la germinación de las esporas, y el difenoconazol fue eficaz para inhibir el crecimiento del micelio (Gao *et al.*, 2017). En un trabajo se determinó la toxicidad del difenoconazol para *Colletotrichum fructicola* aislados del cultivo de Pera, y se encontró que tenía una alta actividad inhibidora contra el crecimiento micelial, pero la inhibición contra la germinación de los conidios era débil (Liang *et al.*, 2020).

El efecto de los fungicidas sobre la germinación de las esporas de *Colletotrichum*, evidenció que los fungicidas multisitio fueron más eficaces que los productos sistémicos, probablemente esto se deba a que este fungicida actúa directamente sobre la germinación de las esporas. Estos resultados coinciden con los ensayos de Moral *et al.*, (2018) donde realizaron una evaluación preliminar de fungicidas y compuestos naturales para el manejo de la antracnosis del olivo causada por especies de *Colletotrichum*, y encontraron que el captan fue eficaz para inhibir la germinación de los conidios (Moral *et al.*, 2018).

Por otro lado, estudios sobre la sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* en café arrojó que la germinación de conidios, fue inhibida con mayor eficacia a bajas concentraciones por el fungicida de contacto clorotalonil (Ferreira *et al.*, 2009). El efecto de los fungicidas sobre el crecimiento micelial y la germinación de los conidios del hongo de la pudrición de la raíz *Cylindrocarpon destructan*, encontró que el benomil fue efectivo contra el crecimiento micelial, pero no mostró una inhibición superior al 30% en la germinación de las conidias, sin embargo, el efecto de inhibición de Mancozeb fue del 99% a una concentración de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Shin *et al.*, 2017).

Los ensayos colorimétricos, mediante la lectura de la absorbancia se han utilizado recientemente como una metodología rápida y precisa para la detección de sensibilidad de los patógenos a distintos fungicidas. Rosado (2016) en ensayos colorimétricos *in vitro*, encontró que los fungicidas clorotalonil, pentiopirad y iprodinil+Fludioxonil fueron los que mejor inhibieron el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* y *C. alatae* asociados a la antracnosis del ñame en Puerto Rico.

Esta metodología también fue empleada para determinar la sensibilidad de aislados de *Fusarium* a fungicidas y se evidenciaron fuertes relaciones entre el método por absorbancia y los métodos tradicionales de placa perforada, concluyendo que en general, el método por colorimetría fue eficaz y ahorró tiempo (Frąc *et al.*, 2016). En busca de evaluar el estado de resistencia a fungicidas y encontrar opciones de control químico para el patógeno *Pyrenopeziza brassicae*, en este estudio, la detección *in vitro* reveló que las poblaciones europeas se habían desplazado hacia una menor sensibilidad a los azólicos, pero la población de América del Norte era muy sensible (King *et al.*, 2021).

7. CONCLUSIONES

- La antracnosis del ñame en el departamento de Córdoba se manifiesta con diferentes síntomas en campo, los cuales se diferencian por el tamaño, color, halo, forma y ubicación en la hoja.
- Las cepas de *Colletotrichum* spp. obtenidas, presentaron diferentes grados de virulencia y capacidad de afectar las especies de *D. alata* y *D. rotundata*.
- Las siete accesiones de ñame evaluadas, presentaron diferentes niveles de resistencia a la antracnosis; cuatro de ellas fueron clasificadas por ser altamente resistentes y resistentes a la enfermedad.
- Las 11 cepas de *Colletotrichum* spp., aisladas de hojas con síntomas de la antracnosis, tuvieron variabilidad morfológica y genética entre sí, identificándose dos especies *C. gloeosporioides* y *C. fruticola*, siendo esta última, una especie que no ha sido reportada en Colombia.
- La sensibilidad de los aislados de *Colletotrichum* spp. a diferentes moléculas de fungidas, pudo valorarse empleando el método convencional de crecimiento de la colonia en cajas de Petrí; así como con el método de la absorbancia de la germinación de esporas; constituyéndose el método de la absorbancia como una nueva estrategia para valorar la sensibilidad de *Colletotrichum* a nuevas moléculas fungidas.
- Las especies de *C. gloeosporioides* y *C. fruticola* fueron sensibles a las moléculas de azoxystrobin, difenoconazol, clorotalonil y captan; con reducida sensibilidad a benomyl y mancozeb. Por lo tanto, los primeros pueden ser usados en programas de manejo integrado de la enfermedad.

8. RECOMENDACIONES

- Analizar la diversidad genética de los aislamientos de *Colletotrichum* mediante la secuenciación parcial de diferentes genes.
- Estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a benomil en las especies de *Colletotrichum* en ñame
- Analizar las influencias de las variables ambientales y realizar ensayos de campo para verificar los efectos de los fungicidas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abang, M. M., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G. A., Mignouna, H. D., & Winter, S. (2006). Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. *Journal of Phytopathology*, 154(1), 51-61.
- Abang, M. M., Fagbola, O., Smalla, K., & Winter, S. (2005). Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose disease of yam (*Dioscorea* spp.). *Journal of Phytopathology*, 153(3), 137-142.
- Abang, M. M., Winter, S., Green, K. R., Hoffmann, P., Mignouna, H. D., & Wolf, G. A. (2001). Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology*, 51(1), 63-71..
- Abang, M., Winter, S., Mignouna, H., Green, K. y Asiedu, R. (2003). Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology* 2, 486-496.
- Abang, M.M., Abraham, W.R., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G., Winter, S. (2009). Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycological research* 113, 130-140.
- Aduramigba, A. O., Asiedu, R., Odebode, A. C., & Owolade, O. F. (2012). Genetic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* in Nigeria using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11(33), 8189-8195.
- Afanador, K.L., Minz, D., Maymon, M., Freeman, S. (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique specie from the genus. *Phytopathology* 93: 579-587.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Academic press,.
- Agronet (Red de Información y Comunicación Estratégica del Sector Agropecuario – Colombia). (2018). Disponible en: <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
- Álvarez, E., Ospina, C.A., Mejía, J.F., Llano, G. (2005). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en Guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. *CIAT. Fitopatología Colombiana*, Vol. 28, No.1
- Alzate, D.A., G.I. Mier, L. Afanador, D.L. Durango, y C.M. García. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*).
- Amusa, N., Adegbite, A., Muhammed, S. y Baiyewu, R. (2003). Yam diseases and its management in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 2, 497-502.

- ANALDEX - Asociación Nacional de Comercio Exterior. (2019). Informe de exportaciones de hortalizas, plantas raíces y tubérculos alimenticios en el primer semestre de 2019. Disponible en: <https://www.analdex.org/2019/08/29/informe-de-exportaciones-de-hortalizas-plantas-raices-y-tuberculos-alimenticios-en-el-primer-semester-de-2019/>
- Anastassiadou, M., Arena, M., Auteri, D., Brancato, A., Bura, L., ... & Villamar-Bouza, L. (2020). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance captan. *EFSA Journal*, 18(9), e06230.
- Andres, C., AdeOluwa, O. O., and Bhullar, G. S. (2017). "Yam (*Dioscorea* spp.)," in *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, Vol. 3., eds B. Thomas, B. G. Murray, and D. J. Murphy (Waltham, MA: Academic Press), 435–441.
- Appiah, Z., Kofi, A., Emmanuel, M., David, A. y Esther, M. (2016). Variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates the causal agent of anthracnose disease of cassava and yam plants in Ghana. *International Journal of Phytopathology*, 5(1), 01-09..
- Arce, C., Varela, I., & Torres, S. (2019). Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*, 381-393.
- Arya, R., Sheela, M., Jeeva, M. y Abhilash, P. (2019). Identification of Host Plant Resistance to Anthracnose in Greater Yam (*Dioscorea alata* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 8(8), 1690-1696.
- Ayodele, M.A., Hughes, J.D. and Asiedu, R. (2006). Yam anthracnose disease: field symptoms and laboratory diagnostics. IITA.
- Azeddine, S., Billard, A., Bach, J., Lanen, C., Walker, A. S., Debieu, D., & Sabine, H. F. D. (2014). *Botrytis pseudocinerea* is resistant to the fungicide fenhexamid due to detoxification by the cytochrome P450 monooxygenase CYP684. In *10es Rencontres de Phytopathologie-Mycologie de la Société Française de Phytopathologie (SFP)* (pp. p-83).
- Baggio, J. S., Wang, N. Y., Peres, N. A., & Amorim, L. (2018). Baseline sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from Brazilian strawberry fields to azoxystrobin, difenoconazole, and thiophanate-methyl. *Tropical Plant Pathology*, 43(6), 533-542.
- Barak, E., & Edgington, L. V. (1984). Glutathione synthesis in response to captan: a possible mechanism for resistance of *Botrytis cinerea* to the fungicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21(3), 412-416.
- Barcelos, Q.L., Pinto, J.M.A., Vaillancourt, L.J., Souza, E.A. (2014). Characterization of *Glomerella* strains recovered from anthracnose lesions on common bean plants in Brazil. *PLoS One* 9, 1e15.
- Barimani, M., Pethybridge, S.J., Vaghefi, N., Hay, F.S., Taylor, P.W.J. (2013). A new anthracnose disease of pyrethrum caused by *Colletotrichum tanacetii* sp. nov. *Plant Pathol.* 62,1248e1257.
- Barnett, H. y Hunter, B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4. a edición. Saint Paul: American Phytopathological Society.

- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 58(7), 649-662.
- Beltrán, J. (2000). Caracterización y diagnóstico del género *Colletotrichum* causante de la antracnosis en ñame y otros cultivos. En ñame: producción de semilla por biotecnología (eds) Guzmán M y Buitrago G. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia.
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (1995). Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? (Vol. 1, p. 48). Brussels: GIFAP.
- Brown, AE., Sreenivasaprasad, S., Timmer LW, (1996). Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from Citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86, 523–7.
- Brown, J. K. (2006). Surveys of variation in virulence and fungicide resistance and their application to disease control. In *The epidemiology of plant diseases* (pp. 81-115). Springer, Dordrecht.
- Campo, R. O., & Royet, J. D. J. (2020). La antracnosis del ñame y estrategias de manejo: una revisión. *Temas Agrarios*, 25(2), 190-201.
- Campo, R.O, Luna, J. y Jiménez, Y. (2009). Selección de genotipos de ñame *Dioscorea* spp. resistente a la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Fitopatología Colombiana* 33(1):7-10.
- Campo, R.O. (2000). La antracnosis, enfermedad limitante del cultivo del ñame. En ñame: producción de semilla por biotecnología (eds) Guzmán M y Buitrago G. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia p 67- 70.
- Campo, R.O. (2011). Manejo integrado de la antracnosis (*Colletotrichum* spp.) en ñame (*Dioscorea alata*) mediante el uso de alternativas para reducir el inóculo primario, la dispersión y el establecimiento del patógeno. informe final de proyecto. universidad de córdoba, col. doi:10.13140/rg.2.1.2576.9846
- Campo, R.O. y Luna, J. (1998). Evaluación de la antracnosis en ñame *Dioscorea alata* var. Diamante 22 en monocultivo e intercalado con la variedad concha de coco. *Ascolfi Informa* 24 (5): 26-27 p.
- Campo, R.O., Luna, J.M. y Jimenez, Y.M. (2009). Selección de genotipos de ñame *Dioscorea* spp. resistente a la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Fitopatología Colombiana* 33(1):7-10.
- Cao, X. R., Xu, X. M., Che, H. Y., West, J. S., & Luo, D. Q. (2019). Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China. *Plant Pathology*, 68(6), 1146-1156.
- Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (2011). Guías Prácticas de Laboratorio para el Manejo de Patógenos del Frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Publicación CIAT No. 375.

- Castro, L., Saquero, M. y Herrera, J. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. Revista colombiana de Biotecnología, (1), 24-35
- Cerón, L.E., Higuera, B.L., Sánchez, J., Bustamante, S., Buitrago, G. (2006). Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* durante su cultivo en medios líquidos. Acta Biológica Colombiana 11, 99-109.
- Chacko, R. J., Weidemann, G. J., Tebeest, D. O., & Correll, J. C. (1994). The use of vegetative compatibility and heterokaryosis to determine potential asexual gene exchange in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biological control*, 4(4), 382-389.
- Chechi, A., Stahlecker, J., Dowling, M. E., & Schnabel, G. (2019). Diversity in species composition and fungicide resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples. *Pesticide biochemistry and physiology*, 158, 18-24.
- Chen, F., Tsuji, S. S., Li, Y., Hu, M., Bandeira, M. A., Câmara, M. P. S., ... & Schnabel, G. (2020). Reduced sensitivity of azoxystrobin and thiophanate-methyl resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya. *Pesticide biochemistry and physiology*, 162, 60-68.
- Chen, S. N., Luo, C. X., Hu, M. J., & Schnabel, G. (2016). Sensitivity of *Colletotrichum* species, including *C. fiorinae* and *C. nymphaeae*, from peach to demethylation inhibitor fungicides. *Plant disease*, 100(12), 2434-2441.
- Chen, S. N., Shang, Y., Wang, Y., Schnabel, G., Lin, Y., Yin, L. F., & Luo, C. X. (2014). Sensitivity of *Monilinia fructicola* from peach farms in China to four fungicides and characterization of isolates resistant to carbendazim and azoxystrobin. *Plant disease*, 98(11), 1555-1560.
- Chen, S., Hu, M., Schnabel, G., Yang, D., Yan, X., & Yuan, H. (2020). Paralogous CYP51 genes of *Colletotrichum* spp. mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology*, 110(3), 615-625.
- Chen, S., Wang, Y., Schnabel, G., Peng, C. A., Lagishetty, S., Smith, K., & Yuan, H. (2018). Inherent resistance to 14 α -demethylation inhibitor fungicides in *Colletotrichum truncatum* is likely linked to CYP51A and/or CYP51B gene variants. *Phytopathology*, 108(11), 1263-1275.
- Chen, X. Y., Dai, D. J., Zhao, S. F., Shen, Y., Wang, H. D., & Zhang, C. Q. (2020). Genetic Diversity of *Colletotrichum* spp. Causing Strawberry Anthracnose in Zhejiang, China. *Plant Disease*, 104(5), 1351-1357.
- CORPORACIÓN PBA. (2009). Programa de investigación participativa para la producción y transformación sostenible del ñame (*Dioscorea* sp) en la Costa Atlántica. 58 p.
- Cosseboom, S. D., & Hu, M. (2021). Diversity, Pathogenicity, and Fungicide Sensitivity of Fungal Species Associated with Late-Season Rots of Wine Grape in the Mid-Atlantic United States. *Plant Disease*, (ja).

- Cox, K. D. (2015). Fungicide resistance in *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab, in the United States. In *Fungicide resistance in plant pathogens* (pp. 433-447). Springer, Tokyo.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Crous, P.W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73, 37e113.
- De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155-168.
- Dean, R., Van kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-kosack, K. E., Pietro, A. D., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, J. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 414-430.
- Deising HB., Werner S. y Wernitz M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect*; 2:1631–41.
- Dhavalé, R. A., Mulekar, V. G., Jaiswal, K. L., Bhosale, A. R., & Rothe, A. S. (2019). In vitro evaluation of non-systemic fungicides against *Colletotrichum gloeosporioides* causing fruit rot in banana. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(5), 1486-1488.
- Dixon, E., Barlow, W., Walles, G., Amsden, B., Hirsch, R. L., Pearce, R., & Pfeufer, E. E. (2020). Cytochrome b mutations F129L and G143A confer resistance to azoxystrobin in *Cercospora nicotianae*, the frog-eye leaf spot pathogen of tobacco. *Plant disease*, 104(6), 1781-1788.
- Dongo, A. B. (2017). Descripción metodológica del análisis Clúster utilizando el algoritmo de Ward.
- dos Santos, W. A., Bezerra, P. A., da Silva, A. C., Veloso, J. S., Câmara, M. P. S., & Doyle, V. P. (2020). Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 143, 106694.
- Egesi, C. N., Odu, B. O., Ogunyemi, S., Asiedu, R., & Hughes, J. (2007). Evaluation of water yam (*Dioscorea alata* L.) germplasm for reaction to yam anthracnose and virus diseases and their effect on yield. *Journal of Phytopathology*, 155(9), 536–543. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.200>
- Espinel, P. (2019). Procedimiento para efectuar una Clasificación Ascendente Jerárquica de un Conjunto de Puntos utilizando el Método de Ward. *Infociencia*, 9(1), 13-18.
- Espinoza, D., Silva, H. V., Leyva, S. G., Marbán, N., & Rebollar, Á. (2017). Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates obtained from strawberry to tiophanate-methyl and azoxystrobin fungicides. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(2), 186-203.
- FAO. (2020). Datos sobre alimentación y agricultura. Recuperado el 2 de septiembre de 2021, de <http://www.fao.org/faostat/es/#data>

- Fernández, E., Rentería, M. E., Ramírez, I., Moreno, S. F., Ochoa, A., & Guillén, D. (2020). *Colletotrichum karstii*: causal agent of anthracnose of *Dendrobium nobile* in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1-6.
- Ferreira, J. B., Abreu, M. S. D., Pereira, I. S., Fernandes, K. D., & Pereira, R. B. (2009). Sensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* (mancha manteigosa do cafeeiro) a diferentes concentrações de fungicidas. *Ciência e Agrotecnologia*, 33, 2052-2058.
- Forcelini, B. B., Seijo, T. E., Amiri, A., & Peres, N. A. (2016). Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. *Plant Disease*, 100(10), 2050-2056.
- Fox, R. T. V., & Narra, H. P. (2006). Plant disease diagnosis. In *The epidemiology of plant diseases* (pp. 1-42). Springer, Dordrecht.
- FRAC (2018). Importance of Multisite Fungicides in Managing Pathogen Resistance. Online publication. https://www.frac.info/docs/default-source/publications/state-ment-on-multisite-fungicides/frac-statement-on-multisite-fungicides-2018.pdf?sfvrsn=3c25489a_2.
- Fraç, M., Gryta, A., Oszust, K., & Kotowicz, N. (2016). Fast and accurate microplate method (Biolog MT2) for detection of *Fusarium* fungicides resistance/sensitivity. *Frontiers in microbiology*, 7, 489.
- FRAC. (2021). Grupos de modo de acción. Disponible en: <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/by-frac-mode-of-action-group>
- Frézal, L., Desquilbet, L., Jacqua, G. y Neema, C. (2012). Quantification of the aggressiveness of a foliar pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, responsible for water yam (*Dioscorea alata*) anthracnose. *European journal of plant pathology*, 134(2), 267-279.
- Frézal, L., Jacqua, G., & Neema, C. (2018). Adaptation of a fungal pathogen to host quantitative resistance. *Frontiers in plant science*, 9, 1554.
- Frossard E, Aighewi BA, Aké S, Barjolle D, Baumann P, Bernet T, Dao D, Diby LN, Floquet A, Hgaza VK, Ilboudo LJ, Kiba DI, Mongbo RL, Nacro HB, Nicolay GL, Oka E, Ouattara YF, Pouya N, Senanayake RL, Six J and Traoré OI (2017) The Challenge of Improving Soil Fertility in Yam Cropping Systems of West Africa. *Front. Plant Sci.* 8:1953. doi: 10.3389/fpls.2017.01953
- Fuentes, D., Silva, H. V., Guarnaccia, V., Mora, J. A., Aranda, S., Bautista, N., & Téliz, D. (2020). *Colletotrichum* species causing anthracnose on avocado fruit in Mexico: current status. *Plant Pathology*.
- Fuentes, D., Silva, H., Guarnaccia, V., Mora, J., Aranda, S., Bautista, N. y Téliz, D. (2020). *Colletotrichum* species causing anthracnose on avocado fruit in Mexico: current status. *Plant Pathology*.
- Fuentes, S. (2015). *Caracterización morfológica, patogénica y molecular de especies de colletotrichum asociados al follaje del cultivo de ñame (Dioscorea spp.)* (Doctoral dissertation).

- Gama, A. B., Baggio, J. S., Rebello, C. S., Lourenco, S. D. A., Gasparoto, M. C. D. G., da Silva Junior, G. J., ... & Amorim, L. (2020). Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* Isolates from Citrus to Carbendazim, Difenconazole, Tebuconazole, and Trifloxystrobin. *Plant disease*, 104(6), 1621-1628.
- Gao, Y. Y., He, L. F., Li, B. X., Mu, W., Lin, J., & Liu, F. (2017). Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to six fungicides and reduction in incidence and severity of chili anthracnose using pyraclostrobin. *Australasian Plant Pathology*, 46(6), 521-528.
- Ghini, R., & Kimati, H. (2000). *Resistência de fungos a fungicidas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Giorgio, T., Adler, L. S., & Sandler, H. A. (2020). *Colletotrichum* Species Isolated from Massachusetts Cranberries Differ in Response to the Fungicide Azoxystrobin.
- González, M. (2012). El Ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 05-15.
- Green KR, Abang MM, Iloba C, 1998. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. In: Proceedings of the 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, UK, Abstract 2.2.128.
- Green, K. R., and Simons, S. A. (1994). 'Dead skin' on yams (*Dioscorea alata*) caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathol.* 43, 1062–1065. doi: 10.1111/j.1365-3059.1994.tb01660.x
- GREEN, K. y SIMONS, S. (1994). Quantitative methods for assessing the severity of anthracnose on yam (*Dioscorea alata*). *Trop. Sci.* 34: 216-224..
- Guarnaccia, V., Groenewald, J. Z., Polizzi, G., & Crous, P. W. (2017). High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39, 32.
- Guillén, D., Cadenas, C. I., Alia, I., López, V., Andrade, M., & Juárez, P. (2017). Inhibición colonial in vitro de un aislado de *Colletotrichum acutatum* Simmonds a tratamientos con fungicidas. *Centro Agrícola*, 44(4), 11-16.
- Gullino, M. L., Tinivella, F., Garibaldi, A., Kemmitt, G. M., Bacci, L., & Sheppard, B. (2010). Mancozeb: past, present, and future. *Plant Disease*, 94(9), 1076-1087.
- Gwa, I. V., Bem, A. A., & Okoro, J. K. (2015). Yams (*Dioscorea rotundata* Poir and *D. alata* Lam.) fungi etiology in Katsina-ala local government area of Benue state, Nigeria. *Journal of Phytopathology and Plant Health*, 3, 38-43.
- Gwa, V. I., & Ekefan, E. J. (2017). Fungal Organisms Isolated from Rotted White Yam (*Dioscorea rotundata*) Tubers and Antagonistic Potential of *Trichoderma harzianum* against *Colletotrichum* Species. *Agri Res & Tech: Open Access J*, 10(3), 555787.
- HAN, Y. C., ZENG, X. G., XIANG, F. Y., ZHANG, Q. H., Cong, G. U. O., CHEN, F. Y., & GU, Y. C. (2018). Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides*

- complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China. *Journal of integrative agriculture*, 17(6), 1391-1400.
- Hu, M. J., Grabke, A., Dowling, M. E., Holstein, H. J., & Schnabel, G. (2015). Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. *Plant Disease*, 99(6), 806-814.
- Hu, M., & Chen, S. (2021). Non-target site mechanisms of fungicide resistance in crop pathogens: A review. *Microorganisms*, 9(3), 502.
- Hua, S., Chen, Z., Li, L., Lin, K., Zhang, Y., Yang, J. y Chen, S. (2020). Differences in immunity between pathogen-resistant and-susceptible yam cultivars reveal insights into disease prevention underlying ethylene supplementation. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 1-11.
- Huanyu, L., Tingting, F., Yun, Z., Tianyou, L., Yuan, L., & Bingliang, X. (2017). Effect Comparison of Five Methods to Extract Fungal Genomic DNA as PCR Templates. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017(16), 7.
- Hulvey, J., Popko Jr, J. T., Sang, H., Berg, A., & Jung, G. (2012). Overexpression of ShCYP51B and ShatrD in *Sclerotinia homoeocarpa* isolates exhibiting practical field resistance to a demethylation inhibitor fungicide. *Applied and environmental microbiology*, 78(18), 6674-6682.
- IDEAM. (2020). Consulta y Descarga de Datos Hidrometeorológicos. Recuperado el 14 de enero de 2020, de <http://dhime.ideam.gov.co/atencionciudadano/>
- Inglis, P. W., Pappas, M. D. C. R., Resende, L. V., & Grattapaglia, D. (2018). Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLoS One*, 13(10), e0206085.
- Islam, A., Schreinemachers, P. and Kumar, S. (2020). Farmers' knowledge, perceptions and management of chili pepper anthracnose disease in Bangladesh. *Crop Protection*, 133,105,139.
- Ivors, K. (2016). PROTOCOL 06-03.1: Modified CTAB extraction of fungal DNA. In *Laboratory protocols for Phytophthora species*. APS.
- Jabs, T., Cronshaw, K., & Freund, A. (2001). New strobilurin resistance mechanism in apple scab (*Venturia inaequalis*). *Mitt. Deutsch. Phytomed. Ges*, 31, 15-16.
- Jagtap, N. M., Ambadkar, C. V., & Bhalerao, G. A. (2015). In vitro evaluation of different fungicides against *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of pomegranate. *International Journal of Agricultural Sciences*, 11(2), 273-276.
- Jehani, M. D., Patel, P. R., & Chaudhary, A. K. (2019). Evaluation of bioagents against *Colletotrichum capsici* caused anthracnose disease of yam (*Dioscorea alata* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 4788-4790.

- Jiménez, Y.M., Campo, R.O., Lopez, L.L. (2009). Caracterización morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del ñame *Dioscorea alata* L. Fitopatología Colombiana 33(1):1-6
- Jung, G., Sang, H., Hulvey, J., Chang, T., y Popko, J. (2017). Multidrug Resistance Conferred by Xenobiotic Detoxification in the Ascomycete Fungus *Sclerotinia homoeocarpa*. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 101-106. © 2017 Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, ISBN: 978-3-941261-15-0
- Jurick, W. M., Macarisin, O., Gaskins, V. L., Janisiewicz, W. J., Peter, K. A., & Cox, K. D. (2019). Baseline sensitivity of *Penicillium* spp. to difenoconazole. *Plant disease*, 103(2), 331-337.
- Katediya, M. A., Jaiman, R. K., & Kumar, S. (2019). Management of chilli anthracnose caused by *Colletotrichum capsici*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 2697-2701.
- Kay, M., Elkin, L. A., Higgins, J. J., and Wobbrock, J. O. (2021). ARTool: Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial ANOVAs. R package version 0.11.1, <https://github.com/mjskay/ARTool>. DOI: 10.5281/zenodo.594511.
- Kim, S., Park, S. Y., Kim, H., Kim, D., Lee, S. W., Kim, H. T. & Choi, W. (2014). Isolation and characterization of the *Colletotrichum acutatum* ABC transporter CaABC1. *The plant pathology journal*, 30(4), 375.
- King, K. M., Bucur, D. E., Ritchie, F., Hawkins, N. J., Kaczmarek, A. M., Duan, Y. & Fraaije, B. A. (2021). Fungicide resistance status and chemical control options for the brassica pathogen *Pyrenopeziza brassicae*. *Plant Pathology*.
- Kumar, G. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, Pathogenicity and Management in India. *J Plant Physiol Pathol* 2:2.
- Kunova, A., Pizzatti, C., Bonaldi, M., & Cortesi, P. (2014). Sensitivity of nonexposed and exposed populations of *Magnaporthe oryzae* from rice to tricyclazole and azoxystrobin. *Plant Disease*, 98(4), 512-518.
- Kwodaga, J. K., Sowley, E. N. K., & Badii, B. K. (2020). Morphological and molecular characterisation of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) isolates obtained from *Dioscorea rotundata* (Poir). *African Journal of Biotechnology*, 19(5), 231-239. ISO 690
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., ... & Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest management science*, 58(9), 876-888.
- Liang, S. H. E. N., Yuxuan, M. A., Min, F. U., Ni, H. O. N. G., & Guoping, W. A. N. G. (2020). Sensitivity of difenoconazole to *Colletotrichum fructicola* at major pear cultivation areas in South China. *农药学报*, 22(1), 54-59.

- Lin, C. H., Wu, W. Q., Liao, X. M., Liu, W. B., Miao, W. G., & Zheng, F. C. (2018). First Report of Leaf Anthracnose Caused by *Colletotrichum alatae* on Water Yam (*Dioscorea alata*) in China. *Plant Disease*, 102(1), 248.
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Sun, X., Qi, X. y Zhang, S. (2016). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Scientific reports*, 6, 32761.
- López, S. P., & Castaño, J. (2020). In vitro effect of four fungicides on *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnosis on the Red Globe grape variety. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 44(172), 747-758.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. *Advances in applied microbiology*, 90, 29-92.
- Luna, L. L., Tamara, R. E., & García, J. A. (2018). Efecto de tipo de tutores y densidad de siembra sobre el rendimiento de ñame espino (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Fave. Sección ciencias agrarias*, 17(2), 53-62.
- Luo, Q., Schoeneberg, A., & Hu, M. (2020). Resistance to azoxystrobin and thiophanate-methyl is widespread in *Colletotrichum* spp. isolates from the Mid-Atlantic Strawberry Fields. *Plant Disease*, (ja).
- Manamgoda, D.S., Udayanga, D., Cai, L., Chukeatirote, E., Hyde, K.D., (2013). Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. *Fungal Divers.* 61, 107e115.
- Marroquín, N. G., Rodríguez, S. L. B., Gutiérrez, Y. A. P., & Hurtado, G. B. (2016). Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de plantas de ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando la técnica "DNA Amplification Fingerprinting (DAF)". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 95-103.
- Martin, P. L., Krawczyk, T., Pierce, K., Thomas, C. A., Khodadadi, F., Aćimović, S., & Peter, K. (2021). Fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the Mid-Atlantic United States. *Plant Disease*, (ja).
- Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., & Freeman, S. (2006). Identification and characterization of benomyl-resistant and-sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). *Phytopathology*, 96(5), 542-548.
- Mehl, A., & Manger-Jacob, F. (2015). Banana Diseases. In *Fungicide Resistance in Plant Pathogens* (pp. 467-479). Springer, Tokyo.
- Mendgen, K., Hahn, M., (2002). Review: plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* 7, 352e356.
- Mercado, A. Q., Dangon-Bernier, F., & Páez-Redondo, A. (2019). Aislamientos endofíticos de *Colletotrichum* spp. a partir de hojas y ramas de mango (*Mangifera indica* L.) cultivar Azúcar en el municipio de Ciénaga, Magdalena, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(166), 65-77.

- Mignouna, H. D., Abang, M. M., Green, K. R., & Asiedu, R. (2001). Inheritance of resistance in water yam (*Dioscorea alata*) to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Theoretical and Applied Genetics*, 103(1), 52-55.
- Mignouna, H. D., Abang, M. M., Onasanya, A., & Asiedu, R. (2002). Identification and application of RAPD markers for anthracnose resistance in water yam (*Dioscorea alata*). *Annals of Applied Biology*, 141(1), 61-66.
- Mignouna, H., Mank, R., Ellis, T., Van Den Bosch, N., Asiedu, R., Abang, M., & Peleman, J. (2002). A genetic linkage map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(5), 726-735.
- Mignouna, H., Mank, R., Ellis, T., Van Den Bosch, N., Asiedu, R., Abang, M. y Peleman, J. (2002). A genetic linkage map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(5), 726-735.
- Mignucci JS, Hepperly PR, Green J, Torres-Lopez R, Figueroa LA (1988). Yam protection. II. Anthracnose, yield and profit of monocultures and interplantings. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 72, 179–89.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - MADR. (2020). Organización de Cadena Nacional del Ñame. Internet. p 1-5 <https://www.minagricultura.gov.co>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - MADR. (2021). Cadena Productiva del Ñame. Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. Internet. p 12-22. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Yuca/Documentos/2021-0331%20Cifras%20Sectoriales%20%C3%B1ame.pdf>
- Mo, J., Zhao, G., Li, Q., Solangi, G. S., Tang, L., Guo, T., & Hsiang, T. (2018). Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Guangxi, China. *Plant disease*, 102(7), 1283-1289.
- Moges, A. D., Admassu, B., Belew, D., Yesuf, M., Njuguna, J., Kyalo, M., & Ghimire, S. R. (2016). Development of microsatellite markers and analysis of genetic diversity and population structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia. *PloS one*, 11(3), e0151257.
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Agalliu, G., de Oliveira, R., Pérez-Rodríguez, M., Roca, L. F., ... & Trapero, A. (2018). Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by *Colletotrichum* species. *Crop Protection*, 114, 167-176.
- Moreira, R. R., Hamada, N. A., Peres, N. A., & De Mio, L. L. M. (2019). Sensitivity of the *Colletotrichum acutatum* species complex from apple trees in Brazil to Dithiocarbamates, Methyl Benzimidazole Carbamates, and Quinone outside inhibitor fungicides. *Plant disease*, 103(10), 2569-2576.

- Münch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N., & Deising, H. B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of plant physiology*, 165(1), 41-51.
- Murray, M. G., and William F. Thompson. (1980). "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA." *Nucleic acids research* 8.19 4321-4326.
- Nakaune, R., & Nakano, M. (2007). Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of β -tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein CaBEN1. *Fungal Genetics and Biology*, 44(12), 1324-1335.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). Taxonomy Browse. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=474922>.
- Neema, C. y Frezal, L. (2018). Adaptation of a fungal pathogen to host quantitative resistance. *Frontiers in plant science*, 9, 1554.
- NEGRETE, J. Y REDONDO, A. (1997). Evaluación de la respuesta a la antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en ñames promisorios, *Dioscorea alata* L. en Córdoba. Univ. de Córdoba.
- Nwadili, C., Augusto, J., Bhattacharjee, R., Atehnkeng, J., Lopez, A., Onyeka, T. y Bandyopadhyay, R. (2017). Comparative reliability of screening parameters for anthracnose resistance in water yam (*Dioscorea alata*). *Plant disease*, 101(1), 209-216.
- Omrane, S., Audéon, C., Ignace, A., Duplaix, C., Aouini, L., Kema, G. & Fillinger, S. (2017). Plasticity of the MFS1 promoter leads to multidrug resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *MSphere*, 2(5), e00393-17.
- Omrane, S., Sghyer, H., Audéon, C., Lanen, C., Duplaix, C., Walker, A. S., & Fillinger, S. (2015). Fungicide efflux and the MgMFS 1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2805-2823.
- Onyeka, T. J., Petro, D., Ano, G., Etienne, S., & Rubens, S. (2006). Resistance in water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in the French West Indies to anthracnose disease based on tissue culture-derived whole-plant assay. *Plant pathology*, 55(5), 671-678.
- Osorio, C. (1989). *Control químico de la antracnosis del ñame causada por Colletotrichum gloeosporioides*, Penz (No. Doc. 25497) CO-BAC, Bogotá).
- Osorio, L. F., Pattison, J. A., Peres, N. A., & Whitaker, V. M. (2014). Genetic variation and gains in resistance of strawberry to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*, 104(1), 67-74.
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Cheng, J. H., Meng, L., & Suh, J. W. (2011). Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in yam by *Streptomyces* sp. MJM5763. *Journal of applied microbiology*, 111(2), 443-455.
- Pardo, C., Calderón, C., Rincón, A., Cárdenas, M., Danies, G., López, L. y Jiménez, P. (2016). Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum*

- gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. *Plant Pathology*, 65(2), 227-237.
- Pardo-De la Hoz, C. J., Calderón, C., Rincón, A. M., Cárdenas, M., Danies, G., López-Kleine, L., ... & Jiménez, P. (2016). Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. *Plant Pathology*, 65(2), 227-237.
- Patel, P., Rajkumar, B. K., Parmar, P., Shah, R., & Krishnamurthy, R. (2018). Assessment of genetic diversity in *Colletotrichum falcatum* Went accessions based on RAPD and ISSR markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 153-159.
- Patrice, N. D. J., Placide, D., Madjerembe, A., Rony, M. T. P., Gabriel, D., Ulrich, B. F., ... & Zachee, A. (2021). In vitro, In vivo and In situ, Effect of Mancozeb 80 WP on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc., Causative Agent of Anthracnose of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Chad and Cameroon. *International Journal of Pathogen Research*, 1-14.
- Penet, L., Briand, S., Petro, D., Bussière, F., & Guyader, S. (2017). Data on microsatellite markers in *Colletotrichum gloeosporioides* sl, polymorphism levels and diversity range. *Data in brief*, 12, 644-648.
- Penet, L., Cornet, D., Blazy, J.-M., Alleyne, A., Barthe, E., Bussière, F., (2016). Varietal dynamics and yam agro-diversity demonstrate complex trajectories intersecting farmers' strategies, networks, and disease experience. *Front. Plant Sci.* 7:1962. doi: 10.3389/fpls.2016.01962
- Penet, L., Guyader, S., Pétro, D., Salles, M. and Bussière, F. (2014). Direct splash dispersal prevails over indirect and subsequent spread during rains in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting yams. *PLoS One*, 9(12), e115757
- Pereira, L. F., de Souza, E. A., Pereira, F. A. C., & Gonçalves, F. M. A. (2019). Investigating variability and behaviour of *Colletotrichum gloeosporioides* strains from lesions of coffee blister spot. *Journal of Phytopathology*, 167(11-12), 645-654.
- PÉREZ D.; CAMPO, R.; JARMA, A. 2015. Respuesta fisiológica del ñame espino (*Dioscorea rotundata* Poir) a las densidades de siembra. *Rev. Cienc. Agr.* 32(2):104 - 112. doi: <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.153202.18>
- PÉREZ, D. J., & CAMPO, R. O. (2016). Efecto de la densidad poblacional sobre el rendimiento de ñame espino (*Dioscorea rotundata* Poir.) tipo exportación. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(1), 89-98.
- Pérez, D. R., Vega, V. M., García, Y. B., & Cabrera, A. R. (2019). Efecto del momento de plantación de plantas producidas in vitro de ñame 'Blanco de Guinea', sobre la producción de minitubérculos. *Agricultura Tropical*, 5(1), 25-33.
- Perez, P. M., & Alberto, R. T. (2020). Chemical Management of Anthracnose-Twister (*Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium fujikuroi*) Disease of Onion (*Allium cepa*). *Plant Pathology & Quarantine*, 10(1), 198-216.

- Péto, D., Onyeka, T., Etienne, S. y Rubens, S. (2011). An intraspecific genetic map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. *Euphytica*, 179(3), 405-416.
- Photita, W., Taylor, P. W., Ford, R., Hyde, K. D., & Lumyong, S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*.
- Pinzón Gutiérrez, Y. A. (2014). Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Pinzón, Y. A., Bustamante, S. L., & Buitrago, G. (2013). Differential molecular diagnosis *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* in yam (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 52-60.
- Pinzón, Y., Bustamante, S. y Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11 (2): 8-18.
- Poti, T., Mahawan, K., Cheewangkoon, R., Arunothayanan, H., Akimitsu, K., & Nalumpang, S. (2020). Detection and molecular characterization of carbendazim-resistant *Colletotrichum truncatum* isolates causing anthracnose of soybean in Thailand. *Journal of Phytopathology*, 168(5), 267-278.
- Rabha, A. J., Naglot, A., Sharma, G. D., Gogoi, H. K., Gupta, V. K., Shreemali, D. D., & Veer, V. (2016). Morphological and molecular diversity of endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* from tea plant, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze of Assam, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 181-187.
- Ramdial, H., Hosein, F. N., & Rampersad, S. N. (2016). Detection and molecular characterization of benzimidazole resistance among *Colletotrichum truncatum* isolates infecting bell pepper in Trinidad. *Plant disease*, 100(6), 1146-1152.
- Reina, Y. C. (2012). El Cultivo de ñame en el caribe colombiano. Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional y Urbana; No. 168.
- Reis, E. M., Guerra, W. D., Reis, A. C., Zanatta, M., Carmona, M., & Sautura, F. (2021). Fungi Resistance to Multisite Fungicides. *Journal of Agricultural Science*, 13(11).
- Ripoche, A., Jacqua, G., Bussière, F., Guyader, S., and Sierra, J. (2007). Survival of *Colletotrichum gloeosporioides* (causal agent of yam anthracnose) on yam residues decomposing in soil. *Appl. Soil Ecol.* 38, 270–278. doi: 10.1016/j.apsoil.2007.10.015
- Roca, M. G., Davide, L. C., Davide, L. M., Mendes-Costa, M. C., Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. *Mycological Research*, 108(11), 1320-1326.

- Rodríguez, R., Ramírez, M. T., De La Vega, O. M., & Simpson, J. (2003). Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. *Plant Pathology*, 52(2), 228-235.
- Roohparvar, R., Mehrabi, R., Van Nistelrooy, J. G., Zwiers, L. H., & De Waard, M. A. (2008). The drug transporter MgMfs1 can modulate sensitivity of field strains of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* to the strobilurin fungicide trifloxystrobin. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(7), 685-693.
- Rosado, Y. (2016). Evaluación de fungicidas orgánicos y convencionales para el control de enfermedades foliares en ñame (*Dioscorea alata* L.) (Doctoral dissertation).
- Sabria, A. F., & Vengadaramana, A. (2019). PCR-RFLP based genetic diversity of *Colletotrichum musae* isolates of banana in Jaffna district.
- Samaras, A., Ntasiou, P., Myresiotis, C., & Karaoglanidis, G. (2020). Multidrug resistance of *Penicillium expansum* to fungicides: whole transcriptome analysis of MDR strains reveals overexpression of efflux transporter genes. *International Journal of Food Microbiology*, 335, 108896.
- Sánchez, P. (2021). Molecular Mechanisms Underlying Fungicide Resistance in Citrus Postharvest Green Mold. *Journal of Fungi*, 7(9), 783.
- Sang, H., Hulvey, J. P., Green, R., Xu, H., Im, J., Chang, T., & Jung, G. (2018). A xenobiotic detoxification pathway through transcriptional regulation in filamentous fungi. *MBio*, 9(4), e00457-18.
- Sangakkara, U. R., and Frossard, E. (2014). Home gardens and *Dioscorea* species – a case study from the climatic zones of Sri Lanka. *J. Agric. Rural Dev. Trop.* 115, 55–65.
- Santacruz, C. (2013). Caracterización morfológica, patogénica y molecular de especies de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del fruto de ají y pimentón *Capsicum* spp. el Valle del Cauca.
- Santos, R. F., Fraaije, B. A., Garrido, L. D. R., Monteiro-Vitorello, C. B., & Amorim, L. (2020). Multiple resistance of *Plasmopara viticola* to Qol and CAA fungicides in Brazil. *Plant Pathology*, 69(9), 1708-1720.
- Schnabel, G., Hu, M. J., & Fernández-Ortuño, D. (2015). Monitoring resistance by bioassay: relating results to field use using culturing methods. In *Fungicide Resistance in Plant Pathogens* (pp. 281-293). Springer, Tokyo.
- Sharma, G., Maymon, M., & Freeman, S. (2017). Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific reports*, 7(1), 1-16.
- Shin, J. H., Fu, T., Park, K. H., & Kim, K. S. (2017). The effect of fungicides on mycelial growth and conidial germination of the ginseng root rot fungus, *Cylindrocarpon destructans*. *Mycobiology*, 45(3), 220-225.

- Siddiqui, M. A., Ali, Z., Chittiboyina, A. G., & Khan, I. A. (2018). Hepatoprotective Effect of Steroidal Glycosides From *Dioscorea villosa* on Hydrogen Peroxide-Induced Hepatotoxicity in HepG2 Cells. *Frontiers in pharmacology*, 9.
- Sierotzki, H. (2015). Respiration inhibitors: complex III. In *Fungicide resistance in plant pathogens* (pp. 119-143). Springer, Tokyo.
- Smith, B. J., & Black, L. L. (1990). Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry.
- Soares, A. C. F., Sousa, C. D. S., Garrido, M. D. S., Perez, J. O., & Almeida, N. S. D. (2006). Actinomicetos do solo com atividade in vitro contra patógenos do inhame *Curvularia eragrostides* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 456-461.
- Sun, W., Wang, B., Yang, J., Wang, W., Liu, A., Leng, L. y Chen, S. (2017). Weighted gene co-expression network analysis of the dioscin rich medicinal plant *Dioscorea nipponica*. *Frontiers in plant science*, 8, 789.
- Suwannarat, S., Steinkellner, S., Songkumarn, P., & Sangchote, S. (2017). Diversity of *Colletotrichum* spp. isolated from chili pepper fruit exhibiting symptoms of anthracnose in Thailand. *Mycological Progress*, 16(7), 677-686.
- Tamara, R. E., Luna, L. L., Espitia, A., Novoa, R. S., Regino, S. M., & De la Ossa, V. A. (2021). Respuesta del ñame espino a diferentes densidades de siembra y altura de espalderas: densidades de siembra en *Dioscorea rotundata*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 23(4), 210-219.
- Torres, C., Tapia, R., Higuera, I., Martin, R., Nexticapan, A., & Perez, D. (2015). Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. *Plant Disease*, 99(11), 1590-1595.
- Tovar, J. M., Mora, J. A., Nava, C., Lima, N. B., Michereff, S. J., Sandoval, J. S., ... & Leyva-Mir, S. G. (2020). Distribution and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Mexico. *Plant Disease*, 104(1), 137-146.
- Trejo, G. I., Ramírez, J. E., & Rodríguez, N. L. (2017). Diagnóstico por Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP) Dirigida al Género de Hongo *Colletotrichum* spp. *AGROECOSISTEMAS TROPICALES*, 55.
- Tripathy, S. K., Maharana, M., Ithape, D. M., Lenka, D., Mishra, D., Prusti, A., ... & Raj, K. R. (2017). Exploring rapid and efficient protocol for isolation of fungal DNA. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 951-960.
- Tugizimana, F., Djami, A. T., Fahrman, J. F., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., & Dubery, I. A. (2019). Time-resolved decoding of metabolic signatures of in vitro growth of the hemibiotrophic pathogen *Colletotrichum sublineolum*. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Uddin, M., Shefat, S., Afroz, M. and Moon, N. (2018). Management of anthracnose disease of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*: A review. *Acta Scientific Agriculture*, 2(10): 169-177.

- Usman, H. M., Tan, Q., Karim, M. M., Adnan, M., Yin, W. X., Zhu, F. X., & Luo, C. X. (2021). Sensitivity of *Colletotrichum fructicola* and *Colletotrichum siamense* of Peach in China to Multiple Classes of Fungicides and Characterization of Pyraclostrobin-Resistant Isolates. *Plant Disease*, 105(11), 3459-3465.
- Villani, S. M., Biggs, A. R., Cooley, D. R., Raes, J. J., & Cox, K. D. (2015). Prevalence of myclobutanil resistance and difenoconazole insensitivity in populations of *Venturia inaequalis*. *Plant disease*, 99(11), 1526-1536.
- Villani, S. M., Hulvey, J., Hily, J. M., & Cox, K. D. (2016). Overexpression of the CYP51A1 gene and repeated elements are associated with differential sensitivity to DMI fungicides in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 106(6), 562-571.
- Wei, L., Zheng, H., Zhang, P., Chen, W., Zheng, J., Chen, C., & Cao, A. (2021). Molecular and biochemical characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates resistant to azoxystrobin from grape in China. *Plant Pathology*.
- Wei, X., Xu, Z., Zhang, N., Yang, W., Liu, D., & Ma, L. (2021). Synergistic action of commercially available fungicides for protecting wheat from common root rot caused by *Bipolaris sorokiniana* in China. *Plant Disease*, 105(3), 667-674.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 115–180. <http://doi.org/10.3114/sim0011>
- White, T. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols (innis, M. Am, Gelfrand, D. H., Sninsky, J. J. and White, J., eds.). Academic Press, San Diego, California. p. 315-322.
- Winch JE, Newhook FJ, Jackson GVH, Cole JS, 1984. Studies of *Colletotrichum gloeosporioides* disease on yam (*Dioscorea alata*) in the Solomon Islands. *Plant Pathology* 33, 467–77.
- Wong, F. P., De la Cerda, K. A., Hernandez-Martinez, R., & Midland, S. L. (2008). Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. *Plant disease*, 92(2), 239-246.
- Wumbei, A., Bawa, J. K. A., Akudugu, M. A., & Spanoghe, P. (2019). Absence of Effects of Herbicides Use on Yam Rots: A Case Study in Wulensi, Ghana. *Agriculture*, 9(5), 95.
- Xavier, K. V., & Vallad, G. E. (2020). Efficacy of Biological and Conventional Fungicide Programs for Foliar Disease Management on Pomegranate (*Punica granatum*) in Florida. *Plant Health Progress*, 21(3), 199-204.
- Xavier, K. V., Kc, A. N., Peres, N. A., Deng, Z., Castle, W., Lovett, W., & Vallad, G. E. (2019). Characterization of *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Pomegranate in the Southeastern United States. *Plant Disease*, 103(11), 2771-2780.
- Young, D. H. (2015). Anti-tubulin agents. In *Fungicide resistance in plant pathogens* (pp. 93-103). Springer, Tokyo.

- Zhang, C., Imran, M., Xiao, L., Hu, Z., Li, G., Zhang, F., & Liu, X. (2021). Difenconazole resistance shift in *Botrytis cinerea* from Tomato in China associated with inducible expression of CYP51. *Plant Disease*, 105(2), 400-407.
- Zhang, L., Song, L., Xu, X., Zou, X., Duan, K., & Gao, Q. (2020). Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Eastern China. *Plant disease*, 104(7), 1960-1968.
- Zhang, Y., Wang, H., Wang, X., Hu, B., Zhang, C., Jin, W., ... & Hong, Q. (2017). Identification of the key amino acid sites of the carbendazim hydrolase (MheI) from a novel carbendazim-degrading strain *Mycobacterium* sp. SD-4. *Journal of hazardous materials*, 331, 55-62.
- Zhou, Y., Xu, J., Zhu, Y., Duan, Y., & Zhou, M. (2016). Mechanism of action of the benzimidazole fungicide on *Fusarium graminearum*: interfering with polymerization of monomeric tubulin but not polymerized microtubule. *Phytopathology*, 106(8), 807-813.
- Ziogas, B. N., & Malandrakis, A. A. (2015). Sterol biosynthesis inhibitors: C14 demethylation (DMIs). In *Fungicide resistance in plant pathogens* (pp. 199-216). Springer, Tokyo.