

**Universidad de Costa Rica
Sede del Atlántico
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Agronomía**

**Caracterización morfológica e identificación molecular de especies
de *Colletotrichum* asociadas a hoja y rama, en el cultivo de café, en
la Zona de los Santos, San José, Costa Rica**

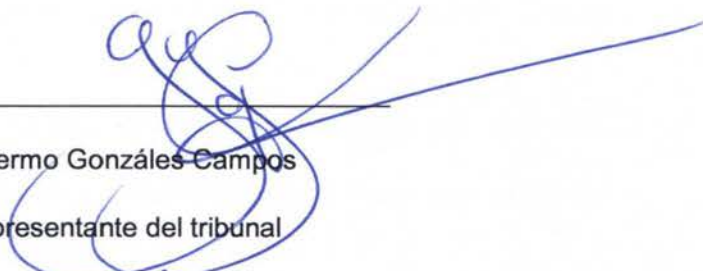
Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica
con énfasis en Fitotecnia

Silvia Elena Mora Mena

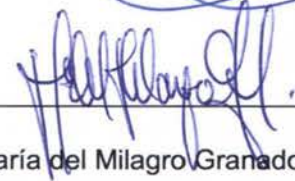
Turrialba, 2022

Este trabajo final de investigación fue aceptado por la Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Escuela de Agronomía de la de la Universidad de Costa Rica, Sede del Atlántico, como requisito parcial para optar por el grado y título de Licenciado en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotecnia.


Firmantes:



Guillermo González Campos
Representante del tribunal



María del Milagro Granados Montero
Directora de tesis



Ariel Romero Guerrero
Miembro del tribunal




Priscila Chaverri Echandi

Miembro del tribunal



Saúl Brenes Gamboa

Representante de la carrera de Agronomía



Silvia Elena Mora Mena

Postulante

DEDICATORIA

Con mucho amor a mi hijo Neythan Gabriel Porras Mora, quien me acompañó durante gran parte de este proceso, desde mi embarazo y ahora ocho meses a mi lado, sacrificando mucho tiempo de estar con él para poder lograr esta meta. Todo mi esfuerzo y logros serán para usted mi niño.

A mi esposo Gabriel Porras, por toda su ayuda y comprensión durante todo este proceso.

A mis padres, que a lo largo de mi vida me han ayudado a llegar hasta este momento.

AGRADECIMIENTOS

Dios es mi fortaleza y mi escudo; En el confié mi corazón, y fui ayudado, por lo que se gozó mi corazón y con cantico le alabaré.

Salmo 28:7

Agradecida primeramente con Dios, por acompañarme en todo este proceso, por cuidar de mi bebé cuando tenía que viajar a la Universidad y por ser mi fortaleza en momentos donde sentía que no podía más, por darme la sabiduría, el entendimiento y conocimiento durante mi formación profesional.

A mi esposo Gabriel Porras, por acompañarme en esos largos viajes a la universidad y esperarme con paciencia, con mi hermano Manuel Mora.

A mis padres Joselito Mora y Yenori Mena, por su compañía y ayuda cuidando a mi hijo todas las veces que lo necesite.

A mi hermano Luis Mora, por las veces que me llevo hasta mi lugar de trabajo.

A mi hermana Paola Mora y su esposo Brian Mata, por abrirme las puertas de su casa, todas las veces que lo necesite.

A mi cuñada Brenda Porras y mi suegra Ana Navarro, por cuidar de Neythan, para avanzar en la escritura de tesis.

A la profesora Milagro Granados por toda su ayuda durante el proceso, incluso su ayuda económica para la secuenciación de muestras.

A los profesores miembros del comité de tesis, por todo su conocimiento y aporte para la realización de esta investigación.

Al profesor Eduardo Granados y al señor Juan Pereira por su ayuda y aporte de material en el laboratorio de investigación, Sede del Atlántico.

El agradecimiento a Efraín Escudero por toda su ayuda y dedicación.

Al señor Jimmy Porras y Eduardo Alvarado, por la oportunidad de utilizar el laboratorio perteneciente al Centro para el Desarrollo de Alternativas Orgánicas (CeDAO), de igual forma por su donación en material para la realización de los aislamientos.

A la Universidad Estatal a Distancia (UNED), por el préstamo de su laboratorio para realizar parte de los aislamientos.

A cada uno de los productores propietarios de las fincas, por su autorización para la toma de muestras.

A mis amigos y familiares por el apoyo y palabras de ánimo.

Tabla de contenidos

I. RESUMEN.....	7
II. INTRODUCCIÓN	8
III. OBJETIVOS	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
IV. MARCO TEÓRICO.....	9
Origen e historia	9
Importancia económica.....	10
Condiciones edafoclimáticas	10
Principales enfermedades del cultivo de café	10
Generalidades del género <i>Colletotrichum</i>	11
Ciclo de vida del hongo	11
Epidemiología de la antracnosis.....	12
Caracterización morfológica de especies de <i>Colletotrichum</i> asociadas al cultivo de café.....	12
<i>Colletotrichum coffeanum</i> :.....	12
<i>Colletotrichum kahawae</i> :	12
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> :	13
<i>Colletotrichum asianum</i> :.....	13
<i>Colletotrichum siamense</i> y <i>C. fructicola</i> :	13
Sintomatología y daño de la enfermedad de antracnosis en plantas de café	13
Identificación molecular.....	14
V. METODOLOGÍA	14
Primera etapa	14
i. Material experimental.....	14
2. Segunda etapa: obtención, identificación y codificación de aislamientos. 16	16
i. Obtención de los aislamientos	16
ii. Obtención de cultivos puros.....	16
iii. Codificación de aislamientos	16
3. Tercera etapa: Caracterización morfológica	18
i. Macromorfología	18
ii. Micromorfología	18
iii. Tasa de crecimiento	19
4. Cuarta etapa: Identificación molecular	19

i.	Extracción de ADN	19
ii.	Realización de PCR.....	20
iii.	Secuenciación.....	20
VI.	RESULTADOS	21
1.	Descripción de síntomas	21
2.	Descripción macromorfológica y micromorfológica de aislamientos.....	24
3.	Identificación molecular	39
VII.	DISCUSIÓN.....	44
VIII.	CONCLUSIONES.....	50
IX.	RECOMENDACIONES	50
X.	LITERATURA CITADA.....	51
	ANEXOS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	22
Figura 2	23
Figura 3	25
Figura 4	26

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.....	15
Tabla 2.....	17
Tabla 3.....	28
Tabla 4.....	33
Tabla 5.....	38
Tabla 6.....	40

I. RESUMEN

El café es un cultivo de gran importancia económica para Costa Rica, ya que ocupa el tercer lugar en productos agrícolas de exportación, representa el 12% de las mismas; de esta actividad dependen alrededor de 38000 familias. Sin embargo, este cultivo se ve afectado por una serie de enfermedades, entre ellas la antracnosis, ocasionada por *Colletotrichum*, un hongo ascomicete fitopatógeno, que afecta tejidos como hojas, ramas y frutos, lo que genera reducción en el rendimiento y por ende pérdidas económicas; la investigación acerca de este problema es reducida, lo que impide conocer la epidemiología y realizar un manejo adecuado.

En esta investigación, se determinaron las especies de *Colletotrichum* presentes en la Zona de los Santos, se analizaron 90 muestras provenientes de nueve fincas ubicadas en los cantones León Cortes, Tarrazú y Dota; se realizó la descripción macromorfológica y micromorfológica, además de la identificación molecular utilizando dos marcadores, el espaciador interno transcrito (ITS) y el factor de elongación (TEF1 α). Entre los resultados obtenidos se mencionan colonias blanquecinas tipo algodonosas, grisáceas con crecimiento algodonoso, colonias color verde olivo y color crema; se obtuvieron conidios con medidas entre $11.47 \mu\text{m} \pm 3.61 \mu\text{m} \times 3.83 \mu\text{m} \pm 1.16 \mu\text{m}$ y $16.67 \mu\text{m} \pm 1.46 \mu\text{m} \times 4.53 \mu\text{m} \pm 0.50 \mu\text{m}$ para el tejido de rama y $12.48 \mu\text{m} \pm 1.41 \mu\text{m} \times 4.19 \mu\text{m} \pm 0.58 \mu\text{m}$ y $17.57 \mu\text{m} \pm 1.66 \mu\text{m} \times 4.49 \mu\text{m} \pm 0.50 \mu\text{m}$ (n= 30) para el tejido de hoja; en cuanto a las especies identificadas se nombraron como especie y como especie con afinidad (aff).

En el cantón de León Cortes se presentaron: *C. aenigma*, *C. boninense*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense* y *C. theobromicola*, *C. aff. boninense*, *C. aff. fructicola*, *C. aff. gloeosporioides*; en el cantón de Tarrazú se identificaron: *C. aenigma*, *C. boninense*, *C. karstii*, *C. theobromicola*, *C. aff. aenigma*, *C. aff. boninense* y *C. aff. gloeosporioides*; mientras que, en el cantón de Dota se identificaron: *C. boninense*, *C. cliviicola*, *C. gloeosporioides*, *C. theobromicola*, *C. siamense*, *C. aff. aenigma* y *C. aff. gloeosporioides*. Es importante realizar el estudio con otros marcadores como β -tubulin (tub2), gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GPDH) Y Actino (ACT), ya que no fue del todo posible resolver las especies presentes con los marcadores utilizados.

II. INTRODUCCIÓN

El cultivo de café, se distribuye en 80 países, con cerca de diez millones de hectáreas dedicadas a la producción de este fruto. (Crespo et al., 2020). En Costa Rica el cultivo del café (*Coffea arabica* L.) es de gran importancia económica, ya que es el tercer producto de exportación. Los principales países de destino son Estados Unidos, Bélgica y Alemania, lo que representa un 2,60% de las exportaciones totales del país y 12% de las agrícolas. De dicha actividad dependen aproximadamente 38.000 familias, de las cuales el 90% son pequeños productores (ICAFFE, 2017).

Este cultivo en el país se centra en ocho regiones: Región Brunca (Coto Brus y Pérez Zeledón), Valle Central (San José, Cartago, Heredia), Guanacaste (Alajuela, Guanacaste, Puntarenas), Tarrazú (Tarrazú, León Cortes, Dota), Valle Occidental (San Ramón, Grecia, Palmares, Naranjo), la región de Orosi, Turrialba y Tres Ríos (ICAFFE, 2015). Dichas zonas varían en cuanto a condiciones climáticas como temperatura, precipitación y humedad, lo que genera variaciones en el rendimiento de los cafetales (ICAFFE 2019), asociado a esto la incidencia de enfermedades en la plantación siendo de mayor importancia la roya (*Hemileia vastatrix* Berk y Broome), ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berk. y M.A Curtis), chasparria (*Cercospora coffeicola*. Berk y Cooke), además de la antracnosis (*Colletotrichum* Corda) (Hernández-Aguilar, 2010)

La antracnosis fue reportada por primera vez en el año 1922, en Kenia y actualmente se encuentra en África, India y América. Además, esta enfermedad tiene la capacidad de presentarse tanto en altitudes de 1100 msnm hasta altitudes de 1900 msnm; sin embargo, presenta mayor incidencia en zonas altas a partir de 1600 msnm (Reyes, 2006).

Esta enfermedad en el cultivo de café, a nivel mundial, es causada por el hongo ascomicete del género *Colletotrichum*, del cual se han encontrado distintas especies relacionadas entre ellas *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. kahawae*, *C. boninense* (Hang et al., 2010). Este hongo ataca diversos tejidos de la planta, (hojas, ramas, flores y frutos) (Hindofofor & Omondi, 2011), genera defoliación de la planta y muerte en las ramas, lo que reduce la producción del cafetal en un 80% (Gil et al., 2002); además, SENASICA (2014) hace referencia al daño que genera en los granos verdes de café, traduciéndose en pérdidas alrededor del 20-60% en la producción anual.

Las pérdidas en cultivos perennes incluyen pérdidas de rendimiento primarias y secundarias; las primarias corresponden a los efectos directos de las enfermedades sobre órganos de la planta como flores y frutos, mientras que, las secundarias afectan, hojas, ramas

y raíces; se considera que las pérdidas secundarias son de mayor importancia, ya que el daño en las ramas y área fotosintética repercutirá en la producción posterior (Avelino et al., 2018).

Estudios han evidenciado que los aislamientos de *Colletotrichum*, incluso cuando se obtienen de un mismo hospedero, pertenecen a especies diferentes, por lo que el criterio de especificidad del hospedero para la identificación del agente causal no es suficiente y puede generar confusión (Pérez et al., 2002), por lo que el empleo de técnicas moleculares ha permitido identificar otras especies ligadas al género *Colletotrichum* (Vieira et al., 2013).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar molecularmente las especies del género *Colletotrichum*, asociadas a la antracnosis en hojas y ramas, en el cultivo de café, en la Zona de los Santos, mediante técnicas microbiológicas y diagnóstico molecular.

Objetivos específicos

- Identificar morfológicamente las especies asociadas a la antracnosis en los tejidos de hoja y rama, del cultivo de café en los tres cantones de la Zona de los Santos.
- Determinar la especie o especies asociadas a antracnosis, en tejidos de hoja y rama en el cultivo de café, de los tres cantones de la Zona de los Santos, mediante la amplificación y secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) y factor de elongación 1 α (TEF1 α).

IV. MARCO TEÓRICO

Origen e historia

El cultivo de café, se originó en el continente africano, siendo el punto de origen las tierras altas de Etiopía y Sudán, de aquí los persas y árabes lo distribuyeron a Arabia y Yemen; por otra parte, los descendientes africanos lo llevaron a lugares como Mozambique y Madagascar. Alrededor del año 1727 fue introducido a América (Brasil) (Cordero- Méndez, 2017), y en los años 1796-1798 ingreso a Costa Rica, sin embargo, fue hasta el año 1816 donde se encontraron las primeras evidencias del cultivo; en el año 1820 se dio la primera exportación de café hacia Panamá con 46kg; posteriormente, en 1832 se exportó a Chile y desde ese momento tomó mayor importancia económica y formó parte del desarrollo de Costa Rica (Solórzano, 2004).

Importancia económica

Dentro de los principales productores a nivel mundial se encuentran Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia y México representando un 56% de la producción mundial (Quintero & Rosales, 2014). La actividad cafetalera en Costa Rica, ocupa el tercer lugar en exportación agrícola superado por piña y banano, lo que genera importantes ingresos económicos al país, además el café costarricense se caracteriza por la alta calidad de taza, principalmente por la altitud de las plantaciones donde se produce esta fruta (Gutiérrez- Alfaro, 2018).

El café producido en Costa Rica, alcanza altos estándares de calidad por lo que se caracteriza como un café diferenciado. En la actualidad Estados Unidos se distingue como uno de sus principales mercados. Dicho país cuenta con un consumo per cápita de 4.24 kg, mientras que otros países como Noruega y Dinamarca tienen consumos de 12.17 kg y 9.51 kg, mientras que Costa Rica consume 3.43 kg (Abarca, 2017).

Condiciones edafoclimáticas

Se considera óptima una altitud de 700-1700 msnm y una precipitación de 1500- 3000 mm anuales, ya que precipitaciones por encima de 3000 mm, incrementan los problemas fitosanitarios (Vignola et al., 2018), en cuanto a la temperatura se mencionan temperaturas óptimas entre 17°C y 23°C (Vignola et al., 2018), y una humedad relativa inferior a 85%, puesto que por encima de esta humedad incrementan los problemas de enfermedades fúngicas (ICAFE, 2011).

En cuanto a las condiciones edáficas, se mencionan suelos planos o ligeramente ondulados esto por su mayor profundidad, retención de agua y nutrientes, sin embargo, algunas zonas de cultivo no cumplen dichas características, por lo que las plantas se adaptan a topografías desfavorables así mismo, la profundidad del suelo debe ser mayor a un metro (Mora, 2008).

Principales enfermedades del cultivo de café

Avelino et al. (2018), mencionan entre las principales enfermedades de interés económico en el cultivo del café, la roya (*Hemileia vastatrix*), la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*), el ojo de gallo (*Mycena citricolor*) y la antracnosis (*Colletotrichum*).

Tras la importancia que presenta la antracnosis en el cultivo de café, es preciso conocer aspectos relevantes de dicha enfermedad. *Colletotrichum* sp. se presenta en diversos cultivos, principalmente frutales tales como mango (Valdés et al., 2017), papaya (Bogantes

Arias & Mora Newcomer, 2013), cítricos (Restrepo Salazar et al., 2012), y el cultivo de café (Hang et al., 2010), entre otros; según mencionan Rojo et al. (2017) las plantas de mayor susceptibilidad son aquellas afectadas por otras enfermedades o bien problemas fisiológicos de la planta, así mismo menciona como agente causal de la enfermedad a *Colletotrichum* sp.

Generalidades del género *Colletotrichum*

Este hongo ascomicete pertenece a la familia Glomerellaceae y al orden Glomerellales (Roskow et al., 2020), de acuerdo a lo mencionado por Reyes (2006), dicha familia se caracteriza principalmente por presentar peritecios oscuros no estromáticos, y una pared delgada. El género *Colletotrichum*, presenta diversidad de especies de acuerdo a cada cultivo, se asocia a plantas herbáceas y leñosas, en este caso las lesiones se centran en frutos, hojas y partes no lignificadas (Cannon et al., 2012). Las especies asociadas a este género se consideran las de mayor importancia entre los hongos fitopatógenos debido a su potencial en la producción de lesiones latentes (Contreras, 2006).

Ciclo de vida del hongo

En el género *Colletotrichum*, los patrones de su ciclo de vida son regulados por familias de genes específicos y la interacción bioquímica a través de enzimas específicas y metabolitos secundarios en la relación hospedero- patógeno (Gan et al., 2016); el ciclo de vida de algunas especies de *Colletotrichum*, involucran la etapa sexual (teleomorfo) y la etapa asexual (anamorfo), estas ocurren en la planta huésped o en restos de la plantación; sin embargo, la etapa asexual es más relacionada con los síntomas de enfermedades, especies como *C. boninense*, *C. destructivum* y *C. gloeosporioides* presentan con mayor frecuencia peritecios (estructuras sexuales) (Ishikawa et al., 2010, Cannon et al., 2012).

La propagación inicia cuando los conidios dentro de un acérvulo subepidérmico en las hojas, se desprenden por acción de la lluvia, e infectan tejido sano como hojas y ramas (Arguedas & Cots, 2012), posteriormente se da el proceso de infección del hongo, iniciando con la adhesión de este al hospedante, la formación de tubos germinativos, la penetración del hongo mediante la formación de apresorios que penetran las células epidurales, produciendo acérvulos y esporulación, así como la alimentación del hongo en su hospedero; repitiendo el ciclo (Canon et al., 2012).

El ciclo de infección de *Colletotrichum*, se da mediante dos estrategias: la colonización hemibiotrófica intracelular y la colonización intramural subcuticular, en ambos casos el estado inicial de infección es similar, sin embargo, el proceso de colonización es diferente en ambos mecanismos (Rojo et al., 2017).

El mecanismo de colonización hemibiotrófica intracelular, se caracteriza principalmente por penetrar la pared celular, una vez que se han penetrado las células epidérmicas, las hifas aumentan de tamaño donde se forman las vesículas de infección y una hifa primaria, estas se encuentran rodeadas por una matriz, debido a esto el protoplasto se mantiene vivo durante esta etapa. Así mismo, la hifa formada coloniza nuevas células epidérmicas, y a partir de esta se forman nuevas hifas necrotróficas secundarias y morfológicamente distintas, estas obtienen nutrientes de las células hospedantes muertas las cuales degradan la pared celular del hospedante (Timmer et al., 2005).

Por otra parte, el mecanismo de colonización intramural subcuticular, se caracteriza por el crecimiento del patógeno debajo de la cutícula, donde se llegan a formar una serie de hifas intramurales después de la infección, tanto las hifas intracelulares como las intercelulares penetran células epidérmicas y mesófilas, llevando a cabo la muerte del hospedante (Rojo et al., 2017).

Epidemiología de la antracnosis

La antracnosis se considera una enfermedad policíclica, debido a que en un año de cultivo se repiten varios ciclos de la enfermedad, ya que los conidios que sobreviven de un ciclo a otro infectan las plantas o tejidos sanos, generando nuevas lesiones por ende nuevos conidios, y a la vez nuevos ciclos de la enfermedad (Moral & Trapero, 2009). La infección generada por *Colletotrichum* se caracteriza por ser latente, lo que indica que el hospedero es atacado por el hongo, pero no presenta síntomas, hasta el momento que son inducidos por factores ambientales, nutricionales, daños por insectos y mecánicos (Alarcón & Mayorga, 2007).

Caracterización morfológica de especies de *Colletotrichum* asociadas al cultivo de café

De acuerdo con Prihastuti et al. (2009), existen diversas especies de *Colletotrichum*, asociadas al cultivo del café, que afectan diversos órganos de la planta; algunas desarrollaron la fase teleomorfa; mientras que otras solo presentaron la fase asexual. Estos autores caracterizaron seis especies a saber:

Colletotrichum coffeanum: se caracteriza principalmente por presentar conidios curvos, hialinos, con tamaño aproximado de 12 μm -18 μm x 4-5 μm , además esta especie se encuentra en hojas y bandolas de la planta, la misma es originaria de Brasil.

Colletotrichum kahawae: la colonia de *C. kahawae*, se caracteriza por presentar color gris oscuro a gris oliváceo, sus conidios presentan forma cilíndrica y tamaño de 7,5 μm -17

$\mu\text{m} \times 3,5 \mu\text{m} - 5 \mu\text{m}$, *C. kahawae* no presenta estado teleomorfo, además, el órgano afectado principalmente es el fruto.

Colletotrichum gloeosporioides: caracterizado por presentar colonias grisáceas, pasando a un gris oscuro-negro, alcanza su desarrollo máximo en 7 días a 28°C, los conidios son cilíndricos, ligeramente cónicos, con un tamaño de 11 μm - x 4,5 μm , esta especie presenta estado teleomorfo (conocido anteriormente como *Glomerella singulata*), indican que afecta principalmente las hojas, aunque también se encuentra en frutos.

Colletotrichum asianum: la coloración de la colonia es blanca verdosa y se torna color verde grisáceo en el centro con la edad, el crecimiento se presenta a lo largo de 7 días a 28°C, posterior de este tiempo, presenta conidios color naranja, estos son hialinos, cilíndricos y estrechos en el centro, su tamaño aproximadamente es de 8,7 μm -20,3 $\mu\text{m} \times 3$ -4,7 μm , el mismo no presenta estado teleomorfo y se encuentra en el fruto principalmente.

Colletotrichum siamense y *C. fructicola*: ambas especies se presentan en el fruto de café, y sus colonias presentan coloración blanquecina- grisácea, con conidios cilíndricos; sin embargo, solo *C. fructicola* presenta estado teleomorfo.

Sintomatología y daño de la enfermedad de antracnosis en plantas de café

El daño en las flores se ubica en los nudos medios e internos de la rama, cuando la flor se encuentra en pre-antesis, se presentan manchas necróticas, hasta que esta produce una necrosis total, el daño en el fruto se registra de igual forma como necrosis, incluso se han registrado daños en la totalidad de nudos productivos de la planta, afecta frutos en todos los estados de desarrollo; los mismos pueden presentar caída si la planta sufre movimientos bruscos, además, si el grano presenta un desarrollo avanzado madura prematuramente y se puede secar por completo (Gil, 2003).

En las hojas, la sintomatología se presenta como manchas necróticas, generalmente de color negro, cuando el daño se encuentra en estado avanzado, la lesión inicia en el ápice y bordes de la hoja y avanza hacia el centro de la lámina foliar, las mismas presentan un borde clorótico que separa la lesión de la parte sana, la lesión se quiebra con facilidad (Gutiérrez et al., 2003). Si la humedad es mayor a 80%, se desarrollan las estructuras reproductivas asexuales del hongo denominados acérvulos, los cuales se observan como puntos negros en el centro de la lesión (Rodríguez et al., 2013). Las lesiones en rama se caracterizan por muerte descendente, que inicia con necrosis en el ápice, que desciende por la rama y afecta los granos presentes en la bandola. La necrosis inicialmente es café, conforme el tejido se va secando se vuelve color grisáceo (Gutiérrez et al., 2003). (Ver anexo 2 y 3)

Identificación molecular

Como parte de los principales métodos de identificación molecular, se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), donde lo que se busca es amplificar un fragmento de ADN de la muestra en estudio; la especificidad del PCR se ve influenciada por la mezcla de la reacción y principalmente por la acción de los marcadores, el régimen de ciclaje, el ADN polimerasa, entre otras (Angarita et al., 2017).

En la identificación de especies de *Colletotrichum*, por lo general se utilizan los marcadores ITS (“Internal Transcribed Spacer”, por sus siglas en inglés), (Pérez- León, 2013, Molina- Chávez et al., 2017), Actin (ACT), β - tubulin (TUB2) (Salazar et al., 2012) y gliceraldehido- 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Weir et al., 2012). Una vez amplificado el ADN, se lleva a cabo la secuenciación de dicho ADN, proceso que consiste en determinar el orden de las bases nitrogenadas en un fragmento de ADN, lo cual permite comparar las secuencias obtenidas con las reportadas en las bases de datos internacionales como el GenBank, permitiendo la identificación de las especies, así como el reconocimiento de relaciones filogénicas entre especies, identificación de posibles recombinaciones y marcadores epidemiológicos, que generan variaciones en la respuesta al manejo de la enfermedad (Angarita et al., 2017).

V. METODOLOGÍA

La investigación se llevó en cuatro etapas: colecta y descripción de material vegetal, aislamiento de hongos a partir de síntomas de antracnosis, caracterización morfológica e identificación molecular de los aislamientos.

Primera etapa: colecta de muestras.

i. Material experimental

Se recolectó material vegetal con síntomas típicos de antracnosis en ramas y hojas de plantas de café variedad Caturra, con una edad aproximada de 20 años.

Se muestreó en nueve sitios, distribuidos en los cantones de León Cortés, Tarrazú y Dota (tres fincas por cantón) (Tabla 1), se consideró prevalencia de la enfermedad para elegir los sitios de muestreo. De cada punto se seleccionaron cinco hojas y cinco ramas con síntomas visibles de antracnosis, para un total de 30 muestras por cantón (15 de hoja y 15 de rama), lo que suma un total de 90 muestras; las cuales fueron recolectadas paulatinamente entre los meses de marzo y octubre de 2021.

El material vegetal se colocó en bolsas de papel debidamente rotuladas con la información pertinente a cada muestra, estas se colocaron en una hielera para ser transportados al laboratorio, en el menor tiempo posible, para realizar el debido aislamiento, las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento.

Tabla 1.

Información general de los sitios de recolección de las muestras de hoja y rama afectadas por antracnosis en fincas de café, Zona de los Santos, San José, Costa Rica.

Cantón	Distrito	Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Propietario
León Cortes	San Isidro	9.675524, -84.067455	1639	Joselito Mora Mora
León Cortes	San Antonio	9.713592, -84.072207	1700	Joselito Mora Mora
León Cortes	San Pablo	9.69528, -84.05094	1680	Edgar Ureña Quirós
Tarrazú	San Marcos	9.6629085, -84.0338579	1510	Hacienda Cafetalera Coopetarrazú RL
Tarrazú	San Marcos	9.6607036, -84.0445921	1500	Victoria Zúñiga Godínez
Tarrazú	San Lorenzo	9.6422954, -84.0263913	1520	Carlos Roberto Naranjo Abarca
Dota	El Jardín	9.686892, - 83.970137	2000	Joel Monge Naranjo
Dota	Santa María	9.6601658, -83.9740922	1758	Matthias Naranjo
Dota	Copey	9.557718, - 83.92294	1915	Matthias Naranjo

2. Segunda etapa: obtención, identificación y codificación de aislamientos.

Los aislamientos se realizaron en el Laboratorio del Centro para el Desarrollo de Alternativas Orgánicas (CeDAO), perteneciente a Coopetarrazú R.L. y ubicado en el cantón de Tarrazú, Zona de los Santos, provincia de San José.

i. Obtención de los aislamientos

Para el aislamiento de las muestras, se siguió la metodología utilizada por Molina-Chávez et al. (2017). De cada muestra recolectada se tomaron cinco secciones de la zona de avance de la enfermedad de 5x5mm, dichas secciones se colocaron en hipoclorito de sodio 1% durante un minuto, posteriormente se sumergieron en alcohol 70% durante un minuto, se enjuagó con agua destilada estéril tres veces y se secaron en papel absorbente esterilizado.

Estas secciones desinfectadas de cada tejido se cultivaron de forma equidistante, en una placa Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo de PDA (papa dextrosa agar) (39g/L) + cloranfenicol (5 mg/L) y se trasladaron a una cámara de incubación a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en oscuridad, durante 5 días, hasta el crecimiento del hongo. Posteriormente, se transfirieron asépticamente discos del borde de crecimiento de las colonias formadas a nueva placas Petri con medio PDA, durante 7-10 días.

ii. Obtención de cultivos puros

Para la obtención de cultivos puros se siguió el procedimiento de cultivo de punta de hifa, descrito por el CIP (2004), el mismo consistió en cultivar una proporción del hongo en una placa Petri con medio de agar agua 3%, e incubar a una temperatura de 25°C , durante 5 días. Luego de ese período con ayuda de un estereoscopio, se cortaron 3 puntas de las hifas detrás de la célula terminal, utilizando un bisturí previamente esterilizado con alcohol y flameado, una vez cortadas las hifas, se transfirieron a una placa con medio de PDA para cada una.

iii. Codificación de aislamientos

Los aislamientos se identificaron con códigos formados por letras y números, como se especifica a continuación: con R para el tejido afectado proveniente de rama y H para hoja; en cuanto al código de cantón, se estableció 00 para León Cortes, 01 para Tarrazú y 02 para el cantón de Dota; además, el número de finca abarca del 1 al 3 y el número de muestra del

1 al 5. En la Tabla 2 se presentan los códigos de identificación correspondientes a los aislamientos realizados.

Tabla 2.

Códigos de identificación para los aislamientos puros de Colletotrichum recuperados de rama y hoja de plantas de café (Coffea arabica) var. Caturra colectados en tres cantones de la zona de Los Santos, San José, Costa Rica.

Cantón	Ubicación	Número de finca	Numero de muestra	Código de identificación	
León Cortes	San Isidro	1	1	R001-1	H001-1
		1	2	R001-2	H001-2
		1	3	R001-3	H001-3
		1	4	R001-4	H001-4
		1	5	R001-5	H001-5
	San Antonio	2	1	R002-1	H002-1
		2	2	R002-2	H002-2
		2	3	R002-3	H002-3
		2	4	R002-4	H002-4
		2	5	R002-5	H002-5
	San Pablo	3	1	R003-1	H003-1
		3	2	R003-2	H003-2
		3	3	R003-3	H003-3
		3	4	R003-4	H003-4
		3	5	R003-5	H003-5
San Marcos	1	1	R011-1	H011-1	
	1	2	R011-2	H011-2	
	1	3	R011-3	H011-3	
	1	4	R011-4	H011-4	
	1	5	R011-5	H011-5	
Tarrazú	San Marcos	2	1	R012-1	H012-1
		2	2	R012-2	H012-2
		2	3	R012-3	H012-3
		2	4	R012-4	H012-4
		2	5	R012-5	H012-5
		3	1	R013-1	H013-1

Dota	San Lorenzo	3	2	R013-2	H013-2
		3	3	R013-3	H013-3
		3	4	R013-4	H013-4
		3	5	R013-5	H013-5
		1	1	R021-1	H021-1
	El Jardín	1	2	R021-2	H021-2
		1	3	R021-3	H021-3
		1	4	R021-4	H021-4
		1	5	R021-5	H021-5
		2	1	R022-1	H022-1
	Santa María	2	2	R022-2	H022-2
		2	3	R022-3	H022-3
		2	4	R022-4	H022-4
		2	5	R022-5	H022-5
		3	1	R023-1	H023-1
	Copey	3	2	R023-2	H023-2
		3	3	R023-3	H023-3
		3	4	R023-4	H023-4
		3	5	R023-5	H023-5

3. Tercera etapa: Caracterización morfológica

i. Macromorfología

Para el análisis macromorfológico, se seleccionaron tres morfotipos de *Colletotrichum* de cada tejido por cada sitio de colecta. Su selección se realizó con base en la morfología y color de las colonias, presencia o ausencia de acérvulos y forma de los conidios.

Cada uno de los morfotipos seleccionados se cultivaron en placas Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA, se incubaron en oscuridad a 24°C, durante 7-14 días, luego se describieron las características color y aspecto (liso, rugoso, polvoso, algodonoso) de cada colonia.

ii. Micromorfología

Se realizó un cultivo en medio de PDA 25 se tomó micelio a los cultivos con quince días de crecimiento y se extendió sobre un portaobjetos, se observó en el microscopio óptico a 100X, se midió el largo y ancho (μm) de los conidios con un micrómetro ocular y se observó la forma (cilíndrico o falcado) con los resultados obtenidos se realizó un ANOVA para la comparación entre aislamientos.

iii. Tasa de crecimiento

Se utilizó el protocolo mencionado en CABI (2012), donde se colocó micelio en una placa Petri con medio PDA, se incubaron a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en oscuridad, durante 8 días, posteriormente se midió el crecimiento diametral (mm/día), de extremo a extremo de la colonia.

4. Cuarta etapa: Identificación molecular

Se eligieron 40 aislamientos, que se muestran con asterisco (*) en las tablas 3 y 4. Se trató de seleccionar cultivos de todos los morfotipos observados, recuperados tanto de hoja como de rama y que provinieran de todos los cantones muestreados. Para cada aislamiento se realizó la extracción del material genético total y amplificación de la región flanqueada, utilizando los marcadores ITS (código de barras para hongos) y TEF 1 α .

i. Extracción de ADN

Dicho procedimiento se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de Costa Rica, Sede del Atlántico, Turrialba, Cartago. La extracción de ADN se realizó de acuerdo a una adaptación de la metodología utilizada por Silva et al. (2009).

De los cultivos puros seleccionados, se colocó micelio en un microtubo estéril de 2 ml, se maceró durante un minuto a 3000 rpm, posteriormente se agregó 500 μL de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, luego se agitó en un molino mezclador MM400 de Retsch, por un minuto y treinta segundos, pasado este tiempo se colocaron los tubos utilizados en baño María durante treinta minutos a una temperatura de 67°C , además, se agregó 500 μL de cloroformo (24:1), se mezcló durante 5 minutos y se centrifugó durante doce minutos a 12500 rpm en centrífuga modelo DSC-01524SM, posterior a ese tiempo, se tomaron 400 μL del sobrenadante obtenido y se colocaron en tubos estériles de microcentrífuga de 1.5 ml, a estos tubos se les agregó 250 μL de alcohol isoamílico y 20 μL de acetato de sodio, dichas muestras se refrigeraron durante 2 horas a una temperatura de -30°C .

Por medio de decantación se eliminó el alcohol isoamílico y el acetato de sodio, posterior se agregó 250 μL de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 12000 rpm, de igual forma por decantación se eliminó el etanol y se secó el pellet de ADN en la cámara de transferencia por 30 minutos, finalmente se añadió 50 μL de Buffer TE para la resuspensión del ADN. El producto de esta extracción se diluyó 1:10 para utilizarlo en la elaboración de PCR.

ii. Realización de PCR

Se realizó siguiendo la metodología aplicada por Pérez et al. (2013), con algunas modificaciones. El ADN obtenido se amplificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para dos regiones genómicas: la región del espaciador interno transcrito, ITS del ADN ribosomal (ADNr) con los cebadores universales ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATG) y la región TEF 1 α con los cebadores EF1567R (ACHGTRCCRATACCACCHAT) y EF728MF (CATYGAGAAGTTCGAGAAGG).

La mezcla de reacción de PCR tuvo un volumen final de 25 μ l compuesta por 7 μ l de agua nanopura estéril, 12.5 μ l de Green Taq DNA Polimerase; 0.5 μ l de BSA (Bovine serum albumin) (20 mg.ml⁻¹); 1 μ l de DMSO, 2.0 μ l de ADN molde (30 mg) y 1 μ l de cada uno de los marcadores.

Para el marcador ITS, se utilizó un perfil de amplificación con un ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de treinta y cinco ciclos incluyendo treinta segundos de desnaturalización a 95°C, treinta segundos de anillamiento a una temperatura de 56°C y una extensión de treinta y cuatro segundos a 72°C; este proceso finaliza con una incubación a 72°C durante 10 minutos. El programa PCR para la región TEF 1 α , se realizó siguiendo la metodología utilizada por Rojas et al. (2010), donde se incluyeron 2 minutos de desnaturalización a 95°C, seguido de cuarenta ciclos de 95°C durante treinta segundos, 53°C por treinta segundos y un ciclo final durante 10 minutos a 72°C. La verificación de la presencia y tamaño de las ampliaciones obtenidas se realizó con gel de agarosa al 1%, mediante electroforesis, mientras que la purificación fue realizada por la compañía Macrogen.

iii. Secuenciación

El fragmento amplificado se envió a la compañía Macrogen, para la secuenciación del ADN, las secuencias obtenidas se editaron, por medio de los programas MEGA para su respectiva alineación y EMBOSS para obtener la secuencia consenso. En cuanto a los resultados de ITS y TEF 1 α , se realizó un BLAST para seleccionar las especies de *Colletotrichum* más cercanas, las secuencias obtenidas se compararon con cinco de las secuencias publicadas para cada espécimen en la base de datos del Banco de Genes del Centro Nacional para la Información Biológica en Estados Unidos (National Center for Biotechnology Information NCBI).

La identidad de cada aislamiento se definió de acuerdo con Escudero et al. (2022), donde se consideró en el rango de especie, aquellas secuencias que obtuvieron similitudes de 97-100%; y se determinó como especie afín (aff.) si se obtuvo entre 90-97%, lo que significa que tiene afinidad a la especie, pero no es idéntica a la especie asignada.

VI. RESULTADOS

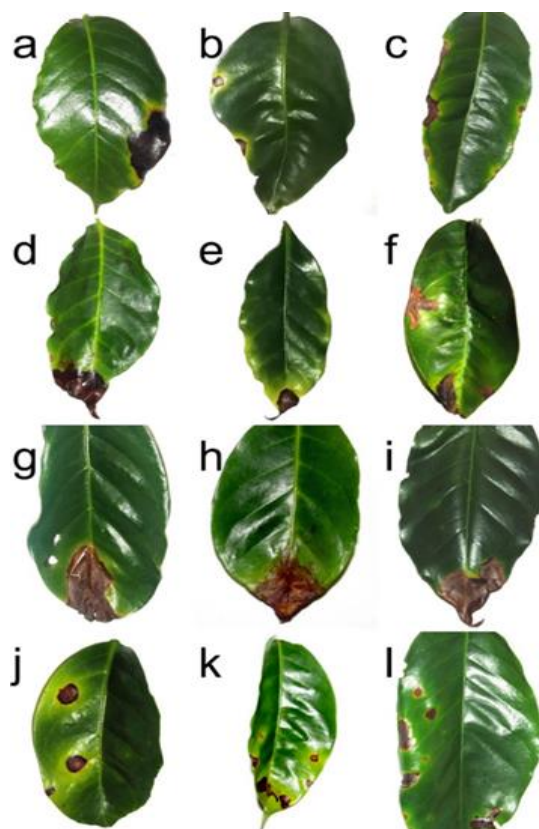
En total se colectaron 144 muestras, entre hojas y ramas, (72 muestras de hoja y 72 muestras de rama), de estas se seleccionaron 90 muestras para la realización de los aislamientos, tomando en cuenta los principales síntomas de antracnosis.

1. Descripción de síntomas

Se observaron cinco síntomas de antracnosis en las hojas de café ([Figura 1](#)) recolectadas en los tres cantones de la Zona de los Santos en el periodo entre abril y octubre de 2021. Los síntomas fueron lesiones quebradizas necróticas en el borde de la hoja, con halo clorótico (amarillo), necrosis húmeda y seca en el ápice de la hoja y lesiones necróticas dispersas sobre la lámina foliar, en cuanto a rama el principal síntoma identificado fue la necrosis, lesión caracterizada por ser descendente, tanto en tejido joven como tejido viejo ([Figura 2](#)).

Figura 1

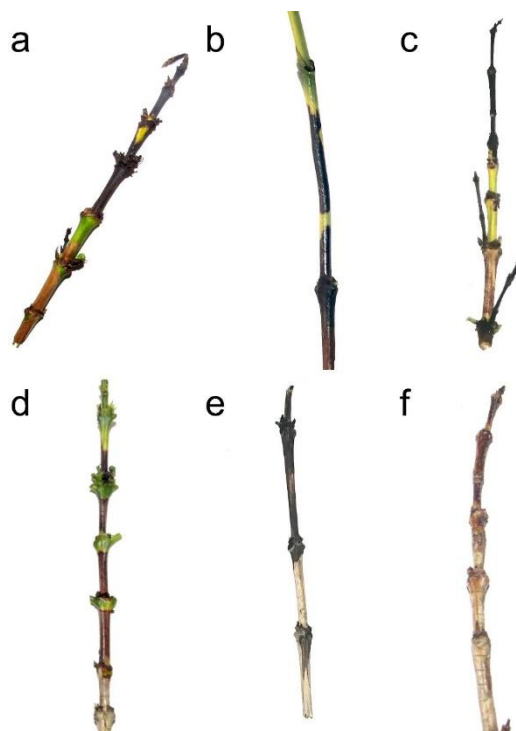
Síntomas de antracnosis en hojas de café (Coffea arabica) var. Caturra, identificados en los tres cantones de la Zona de los Santos.



Nota. (a-b-c síntoma de necrosis y amarillamiento en el borde del tejido foliar), (d-e-f necrosis más oscura en el ápice de la hoja y lesión más húmeda), (g-h-i necrosis más seca y quebradiza en el ápice de la hoja y color café), (j-k-l amarillamiento y necrosis distribuida en la lámina foliar).

Figura 2

Síntomas de antracnosis en ramas de café (Coffea arabica) var. Caturra, identificados en los tres cantones de la Zona de los Santos.



Nota. (a-b-c, necrosis inicial en tejido verde) (d-e-f, necrosis en tejido más viejo, principalmente desciende por la rama).

De la necrosis seca en el ápice de hoja (Figura 1. G, h, i), se obtuvo en total doce aislamientos, 6 provenientes de León Cortes, 3 de Tarrazú y 3 de Dota; en cuanto a la necrosis en el borde de hoja resultaron 16 aislamientos, 6 aislamientos de León Cortes, 5 en Tarrazú y 5 para Dota, el síntoma de necrosis húmeda en ápice fue el que produjo menos aislamientos, con un total de tres aislamientos uno de León Cortes y dos de Tarrazú.

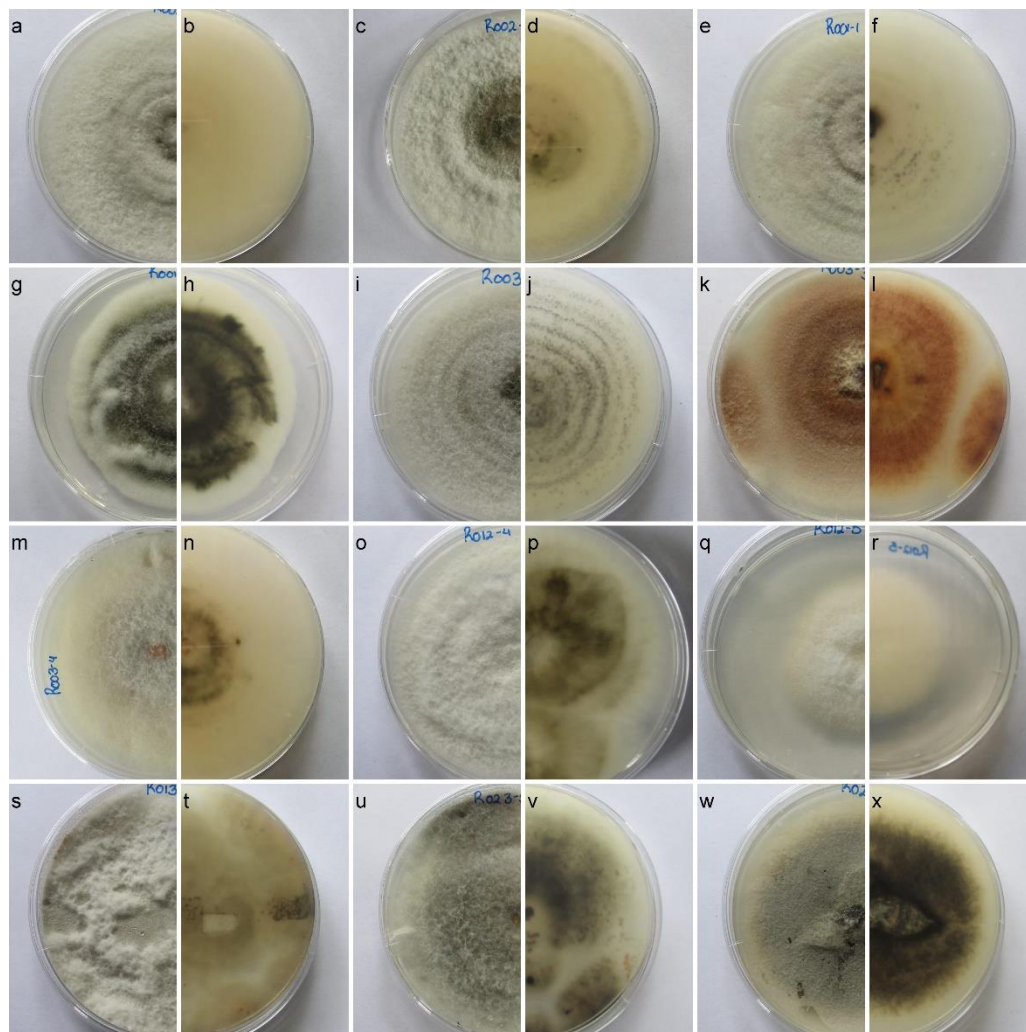
En los síntomas de rama, trece muestras provenientes del cantón de León Cortes registraron la mayor cantidad de aislamientos a partir de necrosis en tejido viejo; mientras que, las muestras provenientes del cantón de Tarrazú presentaron la mayor cantidad de aislamientos a partir de necrosis en tejido joven.

2. Descripción macromorfológica y micromorfológica de aislamientos

Los aislamientos recuperados presentaron diferencias morfológicas ([Figura 3](#) y [Figura 4](#)), entre las principales se mencionan: diversidad en color y textura ([Tabla 3](#)), ya que algunas presentaron un color blanco con crecimiento de micelio aéreo de aspecto algodonoso y coloración crema en el reverso de la colonia con anillos concéntricos, otras presentaron una coloración verde oliva con crecimiento del micelio superficial y crecimiento de micelio blanco en el borde la colonia, además una coloración oscura en el reverso, otra coloración característica fue colonias color crema con anillos concéntricos de color grisáceo y color crema al reverso, así mismo los conidios presentaron diferencias en su forma y medida de acuerdo a cada sitio de muestreo.

Figura 3

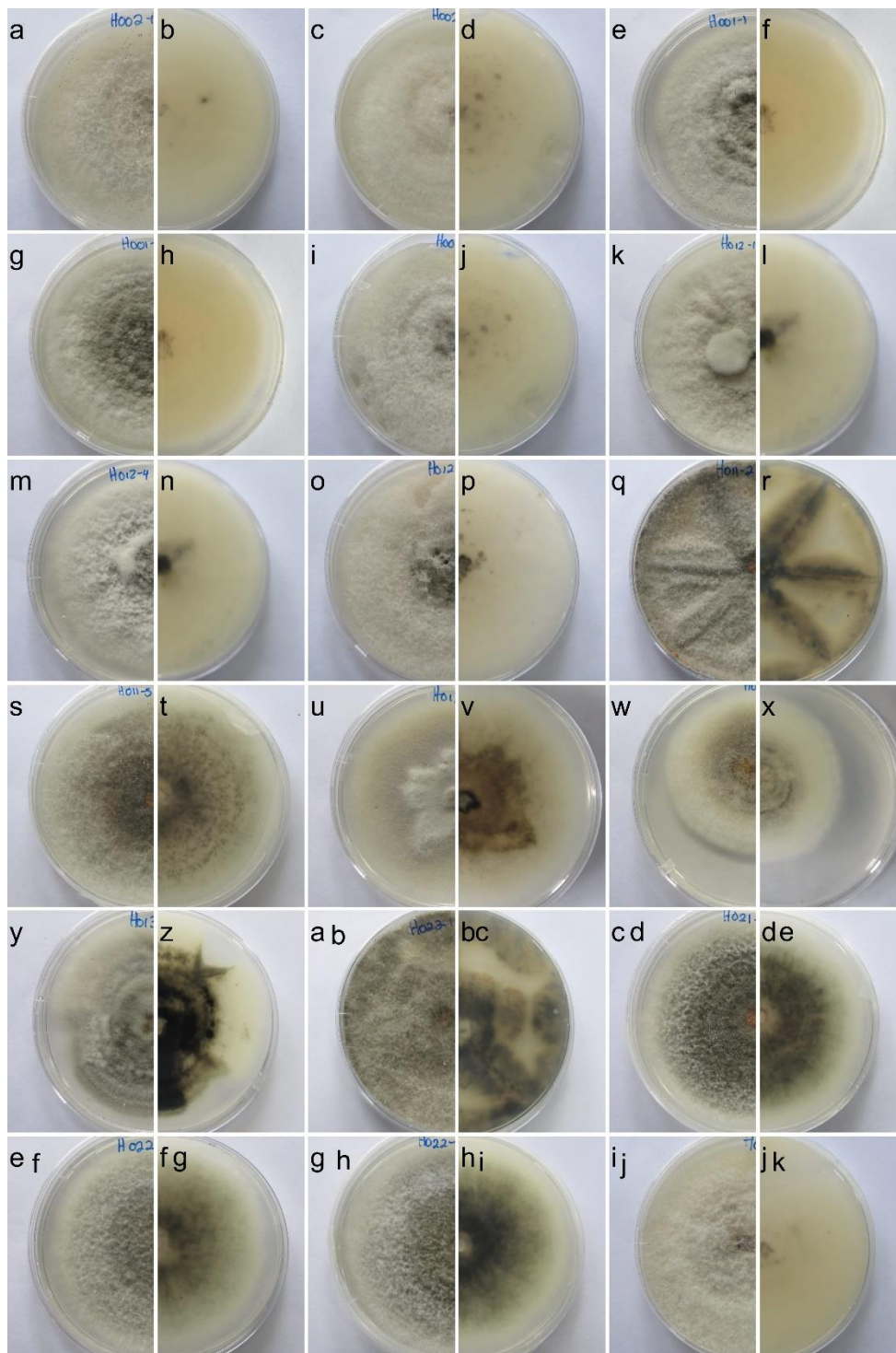
Aislamientos correspondientes a *Colletotrichum*, en ramas de café (*Coffea arabica*) var. Caturra, obtenidos de la Zona de los Santos, San José.



Nota. Se muestra el anverso y el reverso de la colonia respectivamente (a-b *C. aff. boninense* (TEF) / *C. siamense* (ITS) c-d *C. boninense* e-f *C. aff. gloeosporioides* (TEF) / *C. aenigma* (ITS) g-h *C. aff. boninense* (TEF) / *C. boninense* (ITS), i-j *C. aff. gloeosporioides*, k-l *C. aff. gloeosporioides* (TEF) / *C. theobromicola* (ITS), m-n *C. aff. fructicola* o-p *C. aff. aenigma*, s-t *C. aff. gloeosporioides*, u-v *C. aff. gloeosporioides*, w-x *C. boninense*).

Figura 4

Aislamientos correspondientes a *Colletotrichum*, en hojas de café (*Coffea arabica*) var. Caturra, obtenidos de la Zona de los Santos, San José.



Nota. Se muestra el anverso y el reverso de la colonia respectivamente (**a-b** *C. aff. boninense* (TEF) / *C. aenigma* (ITS), **c-d** *C. aff. gloeosporioides*, **e-f** *C. aff. boninense* (TEF) / *C. aenigma* (ITS), **g-h** *C. aff. boninense* (TEF) / *C. aenigma* (ITS), **i-j** *C. aff. gloeosporioides*, *C. aff. siamense* **k-l** *C. boninense*, **m-n** *C. boninense*. **o-p** *C. boninense*. **q-r** *C. aff. gloeosporioides* (TEF) / *C. aenigma* **s-t** *C. theobromicola*

u-v *C. aff. gloeosporioides* (TEF) / *C. theobromicola* (ITS), **w-x** *C. karstii*, **y-z** *C. aff. boninense* (TEF) / *C. boninense* (ITS), **ab-bc** *C. aff. gloeosporioides*, **cd-de** *C. gloeosporioides*, **ef-fg** *C. aff. aenigma* **gh-hi** *C. aenigma* **ij-jk** *C. aff. gloeosporioides*).

La medición de conidios (n=30 / aislamiento), presentó diferencias entre las zonas de muestreo (Tabla 5). En el cantón de León Cortés la longitud de los conidios, tanto de hoja como rama, para los aislamientos provenientes de San Pablo mostraron diferencia con respecto a San Isidro y San Antonio.

Por otra parte, en el cantón de Tarrazú se presentó diferencia significativa en el largo y ancho de los conidios, tanto de rama como de hoja, en las tres zonas de muestreo. En cuanto al cantón de Dota, los aislamientos de rama provenientes de Santa María tienen medidas de largo significativamente más bajas que los aislamientos recuperados en los distritos de Copey y El Jardín; para el ancho del conidio no se detectó diferencia entre distritos.

La tasa de crecimiento de los aislamientos recuperados de rama de los distritos de San Antonio, San Lorenzo y El Jardín mostraron valores significativamente más bajos que el resto de los aislamientos. A nivel de hoja, los aislamientos provenientes de San Antonio y San Pablo también presentaron tasas estadísticamente más bajas.

Tabla 3.

Caracterización morfológica de los aislamientos de Colletotrichum, en el tejido de rama correspondientes a cada sitio de muestreo. Zona de los Santos, San José.

Aislamiento	Zona de muestreo	Característica de la colonia	Conidio			Tasa de crecimiento (mm/día)
			Longitud promedio (µm)	Ancho promedio (µm)	Forma	
R001-1*	San Isidro (León Cortes)	Coloración grisácea con crecimiento superficial, color crema al reverso, y una producción de acérvulos negros, además presentó un anillamiento color negro	13	4	Cilíndrico recto	0.70
R001-2*		Color de colonia gris, con crecimiento de micelio algodonoso y color crema al reverso, con producción de acérvulos negros.	14	4	Cilíndrico recto	0.70
R001-3		Color de colonia gris, con crecimiento de micelio algodonoso y color crema al reverso, con producción de acérvulos y anillos concéntricos negros.	13	5	Cilíndrico recto	0.70
R001-4		Coloración grisácea con crecimiento superficial, color crema al reverso, y una producción de acérvulos anaranjados.	12	4	Cilíndrico recto	0.65
R001-5*		Colonia color verde olivo y crecimiento superficial, con reverso color café oscuro, presentó acérvulos anaranjados	13	4	Cilíndrico recto	0.70
R002-1*		Coloración blanquecina con crecimiento algodonoso y color crema al reverso, presentó acérvulos negros y anillamiento color café.	12	4	Cilíndrico recto	0.60
R002-2		Colonia color café, crecimiento superficial y anillamiento oscuro, el reverso de la colonia fue un café más claro, sin acérvulos.	Sin conidios	Sin conidios	_____	0.50

R002-3*		Colonia blanquecina, con crecimiento superficial, y color café en el reverso, producción de acérvulos anaranjados.	14	4	Cilíndrico recto	0.55
R002-4	San Antonio (León Cortes)	Coloración blanca en la periferia y verde musgo en el centro, con crecimiento superficial, sin acérvulos, reverso color café oscuro en el centro y un borde blanco.	13	4	Cilíndrico recto	0.35
R002-5		Crecimiento blanquecino tipo algodonoso, anillamiento café, el reverso de la colonia presentó color crema, con abundantes acérvulos color negro.	12	4	Cilíndrico recto	0.60
R003-1		Color de la colonia grisáceo, con crecimiento superficial, color crema en el reverso y presencia de acérvulos anaranjados.	14	6	Cilíndrico recto	0.70
R003-2*	San Pablo (León Cortes)	Color de la colonia grisáceo, con crecimiento superficial y anillos concéntricos color café, color crema en el reverso y presencia de acérvulos anaranjados.	12	4	Cilíndrico recto	0.64
R003-3*		Colonia color café oscuro en ambos lados, sin presencia de acérvulos	5	2	Clavado	0.60
R003-4*		Colonia color gris, crecimiento algodonoso, acérvulos color anaranjado y el reverso de la colonia color crema.	13	4	Cilíndrico recto	0.65
R003-5		Colonia color gris oscuro, crecimiento algodonoso y anillamiento negro, acérvulos color anaranjado y el reverso de la colonia color crema.	13	4	Cilíndrico recto	0.70
R011-1		Colonia color gris y acérvulos anaranjados, reverso color gris.	Sin conidios	Sin conidios	_____	0.75
R011-2*		Color café en la parte aérea y café oscuro en el reverso de la colonia, crecimiento superficial, no se observaron conidios.	Sin conidios	Sin conidios	_____	0.70

R011-3	San Marcos Hacienda Coopetarrazú (Tarrazú)	Colonia color gris claro con el centro más oscuro, reverso color blanco.	15	5	Cilíndrico recto	0.75
R011-4		Colonia blanquecina, de crecimiento algodonoso, presencia de acérvulos color anaranjado	14	5	Cilíndrico recto	0.60
R011-5		Colonia grisácea, con el reverso color crema, presentó un crecimiento superficial y acérvulos negros.	14	5	Cilíndrico recto	0.75
R012-1	San Marcos (Tarrazú)	Colonia color crema, con crecimiento algodonoso, en el reverso color gris.	15	5	Cilíndrico recto	0.70
R012-2		Colonia color crema, con crecimiento algodonoso, acérvulos color anaranjado, en el reverso presentó color gris.	15	5	Cilíndrico recto	0.70
R012-3		Colonia coloración crema, con crecimiento algodonoso y anillos color café, acérvulos negros y coloración gris al reverso.	16	5	Cilíndrico recto	0.65
R012-4*		Colonia color gris tanto en la parte aérea como en el reverso, con acérvulos color anaranjado.	16	5	Cilíndrico recto	0.60
R012-5		Colonia color gris, con anillos concéntricos color negro. Acérvulos color anaranjado.	14	4	Clavado	0.70
R013-1	San Lorenzo (Tarrazú)	Coloración grisácea en la parte aérea y reverso, con crecimiento algodonoso, y acérvulos color anaranjado	15	4	Cilíndrico recto	0.65
R013-2*		Colonia color crema en ambos lados, crecimiento superficial y acérvulos color negro.	17	4	Cilíndrico recto	0.70
R013-3*		Colonia blanquecina en ambos lados, crecimiento algodonoso, con escasa cantidad de acérvulos color negro.	15	5	Cilíndrico recto	0.50
R013-4*			16	4	Cilíndrico recto	0.70

		Colonia color crema, con crecimiento superficial y acérvulos color anaranjado, en la parte reversa presentó color verde olivo.				
R013-5		Coloración grisácea en la parte aérea y reverso, crecimiento algodonoso, y acérvulos anaranjados, presencia de anillos concéntricos de color negro.	15	4	Cilíndrico recto	0.60
R021-1		Colonia blanquecina con el centro crema, crecimiento algodonoso y acérvulos color negro, el reverso de la colonia se presentó de color café oscuro.	18	4	Cilíndrico recto	0.63
R021-2	El Jardín (Dota)	Colonia color crema, con acérvulos de color anaranjado y crecimiento superficial, en el reverso presentó color gris.	16	5	Cilíndrico recto	0.64
R021-3*		Colonia de color crema con anillos concéntricos color café y acérvulos color anaranjado, en su parte reversa se presentó color gris.	17	4	Cilíndrico recto	0.66
R021-4*		Colonia verde olivo, con acérvulos color anaranjado, el reverso de la colonia de igual forma se presentó verde.	16	5	Cilíndrico recto	0.68
R021-5		Colonia color verde olivo, en la parte reversa se presentó color gris, se desarrollaron acérvulos color anaranjado.	17	4	Clavado	0.45
R022-1*		Colonia color crema, con crecimiento algodonoso, en el reverso de la colonia se presentó color café y acérvulos color negro.	15	4	Cilíndrico recto	0.75
R022-2*	Santa María (Dota)	Coloración de la colonia crema con el centro café oscuro, se desarrollaron acérvulos color negro, sin conidios.	Sin conidios	Sin conidios	_____	0.70
R022-3		Colonia blanquecina en ambos lados, sin presencia de acérvulos	13	4	Cilíndrico recto	0.70
R022-4		Colonia blanquecina en ambos lados, sin presencia de acérvulos	16	4	Cilíndrico recto	0.70

R022-5*		Colonia color blanquecina con anillos concéntricos color café, el reverso de la colonia se presentó de color café y acérvulos color anaranjado.	15	5	Cilíndrico recto	0.70
R023-1*		Colonia coloración crema, con el reverso color gris, de crecimiento algodonoso y acérvulos color anaranjado.	18	5	Cilíndrico recto	0.70
R023-2	Copey (Dota)	Colonia coloración crema, con el reverso color gris y acérvulos color anaranjado.	14	4	Cilíndrico recto	0.65
R023-3		Colonia color blanco, con anillos concéntricos café, y acérvulos color negro, el reverso de la colonia presentó color gris claro.	Sin conidios	Sin conidios	—	0.63
R023-4		Colonia color blanco, acérvulos color anaranjado, el reverso de la colonia presentó color gris claro.	17	4	Cilíndrico recto	0.70
R023-5*		Colonia color blanco, con anillos concéntricos café, y acérvulos color negro, el reverso de la colonia presentó color gris claro.	17	5	Cilíndrico recto	0.65

(* aislamientos con identificación molecular).

Tabla 4.

Caracterización morfológica de los aislamientos de Colletotrichum, en el tejido de hoja correspondientes a cada sitio de muestreo. Zona de los Santos, San José.

Aislamiento	Distrito	Característica de la colonia	Conidio			Tasa de crecimiento (mm/día)
			Longitud (µm)	Ancho µm	Forma	
H001-1*	San Isidro (León Cortes)	Colonia con coloración grisácea y crecimiento algodonoso y formación de anillos concéntricos color negro, sus acérvulos son de color anaranjado y en su reverso presentó color crema.	12	4	Cilíndrico recto	0.56
H001-2		Coloración grisácea en la parte aérea y verde olivo en la parte reversa con anillos concéntricos color café y acérvulos anaranjados.	12	4	Cilíndrico recto	0.70
H001-3		Coloración de la colonia tanto en parte aérea como en reverso fue gris, anillamiento concéntrico color café.	Sin conidios	Sin conidios	_____	0.68
H001-4*		Coloración de la colonia grisácea, con acérvulos anaranjados y un reverso color crema.	12	4	Cilíndrico recto	0.70
H001-5		Colonia color café, con crecimiento algodonoso, en el reverso se presentó un color crema con el centro negro.	13	4	Cilíndrico recto	0.65
H002-1*	San Antonio (León Cortes)	Colonia blanquecina, con anillamiento color café y crecimiento algodonoso, acérvulos anaranjados y en el reverso se presentó color crema.	14	4	Cilíndrico recto	0.70
H002-2		Colonia blanquecina, con el reverso color gris y anillos concéntricos color café y acérvulos color negro.	14	4	Cilíndrico recto	0.68

H002-3		Colonia blanquecina, con el reverso color negro	Sin conidios	Sin conidios	_____	0.40
H002-4		Colonia blanquecina con anillos concéntricos color negro y acérvulos anaranjados.	13	4	Cilíndrico recto	0.57
H002-5*		Colonia blanquecina con anillos concéntricos color negro y acérvulos anaranjados, el reverso de la colonia se presentó de color crema.	12	5	Cilíndrico recto	0.60
H003-1		Colonia blanquecina con anillos concéntricos color negro y acérvulos anaranjados el reverso de la colonia se presentó de color crema.	12	4	Cilíndrico recto	0.57
H003-2	San Pablo (León Cortes)	Colonia grisácea, con el reverso de la colonia color negro, crecimiento superficial.	13	4	Cilíndrico recto	0.60
H003-3		Colonia grisácea con el borde blanco, el reverso de la colonia es color verde oscuro. No se observaron conidios.	Sin conidios	Sin conidios	_____	0.55
H003-4*		Colonia grisácea, con crecimiento superficial y acérvulos color anaranjado, el reverso de la colonia fue de color crema.	13	4	Cilíndrico recto	0.60
H011-1	San Marcos Hacienda Coopetarrazú	Colonia color grisácea en ambos lados de crecimiento, presentó acérvulos color negro.	17	5	Cilíndrico recto	0.70
H011-2*	(Tarrazú)	Colonia grisácea, con crecimiento de tipo algodonoso y acérvulos color negro, el reverso de la colonia se presentó de color crema.	16	5	Cilíndrico recto	0.75
H011-3		Colonia grisácea, con crecimiento de tipo algodonoso y acérvulos color negro, el reverso de la colonia se presentó de color crema.	15	4	Cilíndrico recto	0.70

H011-4*		Color de colonia verde olivo, con acérvulos color negro, el reverso de la colonia se presentó de color gris.	16	5	Clavado	0.50
H011-5		Colonia grisácea en ambos lados de crecimiento con acérvulos de color anaranjado y crecimiento de tipo algodonoso.	16	5	Clavado	0.60
H012-1*		Colonia de coloración grisácea en ambos lados de crecimiento, con acérvulos color anaranjado y crecimiento tipo algodonoso.	14	5	Cilíndrico recto	0.75
H012-2	San Marcos (Tarrazú)	Colonia de coloración grisácea en ambos lados de crecimiento, con acérvulos color negro.	15	5	Cilíndrico recto	0.70
H012-3		Colonia color blanquecina, con crecimiento tipo algodonoso y anillamiento color verde.	15	5	Cilíndrico recto	0.70
H012-4*		Colonia color crema con el reverso de la colonia verde olivo, presencia de acérvulos color anaranjado.	15	5	Cilíndrico recto	0.70
H012-5*		Colonia color crema con anillamiento color verde, crecimiento algodonoso y acérvulos color anaranjado, reverso de la colonia color gris.	14	5	Cilíndrico recto	0.78
H013-1		Colonia de coloración grisácea en ambos lados de crecimiento, con acérvulos color anaranjado y crecimiento tipo algodonoso.	13	4	Cilíndrico recto	0.70
H013-2*	San Lorenzo (Tarrazú)	Colonia color crema y el reverso color gris con crecimiento de tipo algodonoso y acérvulos color anaranjado.	15	5	Clavado	0.60
H013-3		Colonia color crema y el reverso color gris, no se formaron acérvulos.	16	5	Cilíndrico recto	0.70

H013-4*		Colonia color gris en el centro y blanca en el borde, crecimiento tipo algodonoso, con anillamiento color verde y acérvulos color anaranjado, el reverso de la colonia es oscura en el centro y crema en el borde.	16	5	Cilíndrico recto	0.60
H013-5*		Colonia color crema, y gris en su reverso, con crecimiento tipo algodonoso y acérvulos color negro.	16	4	Cilíndrico recto	0.75
H021-1		Colonia color crema en ambos lados de la colonia, con acérvulos color anaranjado.	16	4	Cilíndrico recto	0.60
H021-2*	El Jardín (Dota)	Colonia color gris y acérvulos color anaranjado.	17	4	Cilíndrico recto	0.70
H021-3*		Colonia de coloración grisácea con el reverso color crema, sus acérvulos son anaranjados y presentó un anillamiento color verde.	18	5	Cilíndrico recto	0.65
H021-4		Coloración grisácea en ambos lados de la colonia, con acérvulos anaranjados y crecimiento superficial.	17	5	Cilíndrico recto	0.67
H021-5		Colonia grisácea en ambos lados de crecimiento, anillamiento color verde y acérvulos anaranjados.	18	5	Cilíndrico recto	0.70
H022-1*		Colonia color crema, el reverso color gris, y acérvulos anaranjados.	18	4	Cilíndrico recto	0.80
H022-2	Santa María (Dota)	Colonia color gris, con el reverso color crema, y acérvulos color anaranjado.	18	4	Cilíndrico recto	0.70
H022-3		Colonia grisácea en ambos lados de crecimiento, acérvulos anaranjados y crecimiento algodonoso.	18	5	Clavado	0.70

H022-4*		Colonia grisácea, con el reverso color verde olivo, se presentaron acérvulos color anaranjado.	17	4	Clavado	0.69
H022-5*		Colonia color crema, con acérvulos color negro y el reverso de la colonia presentó un color verde olivo.	17	5	Cilíndrico recto	0.73
H023-1*		Colonia blanquecina con el centro café, crecimiento tipo algodonoso y reverso color blanco. Producción de acérvulos anaranjados.	13	4	Cilíndrico recto	0.75
H023-2	Copey (Dota)	Colonia color crema en ambos lados de crecimiento, crecimiento algodonoso, no se observaron conidios.	Sin conidios	Sin conidios	—	0.65
H023-3*		Colonia color crema con anillamiento de color verde, el reverso de la colonia fue color café y los acérvulos presentes de color anaranjado.	17	5	Cilíndrico recto	0.60
H023-4		Colonia coloración crema, con el reverso color gris, anillamiento color verde y acérvulos color anaranjado.	17	5	Cilíndrico recto	0.73
H023-5		Colonia coloración blanquecina en ambos lados de crecimiento, con el centro color café oscuro.	18	4	Cilíndrico recto	0.74

(* aislamientos con identificación molecular).

Tabla 5.

Cantón	Distrito	Largo del conidio (μ)		Ancho del conidio (μ)		Tasa de crecimiento (mm/día)	
		Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja
León Cortes	San Isidro	12.92±1.00 b	12.48±1.41 b	4.25±0.84 b	4.19±0.58 b	0.69±0.02 b	0.66±0.06 b
	San Antonio	12.30±1.48 b	13.08±1.82 b	4.43±0.53 b	4.35±0.63 b	0.52±0.10 a	0.57±0.11 a
	San Pablo	11.47±3.61 a	12.87±1.38 a	3.83±1.16 a	4.29±0.50 b	0.66±0.04 b	0.58±0.02 a
Tarrazú	San Marcos	14.51±1.32 a	15.87±2.09 c	4.59±0.49 a	4.73±0.44 b	0.71±0.07 b	0.65±0.10 b
	San Lorenzo	15.68±1.68 c	15.32±1.98 b	4.59±0.49 a	4.59±0.53 a	0.63±0.08 a	0.67±0.07 b
	San Marcos 2	15.25±1.69 b	14.89±1.57 a	4.68±0.50 b	4.73±0.44 b	0.67±0.04 b	0.71±0.07 b
Dota	El Jardín	16.67±1.46 b	17.23±2.03 c	4.51±0.50 b	4.53±0.50 b	0.61±0.09 a	0.68±0.06 b
	Santa María	14.86±1.86 a	17.57±1.66 c	4.36±0.55 a	4.49±0.50 b	0.71±0.02 b	0.72±0.05 b
	Copey	16.57±2.24 b	16.24±2.34 b	4.48±0.50 b	4.49±0.50 b	0.67±0.03 b	0.69±0.07 b

Medida promedio de treinta conidios de cada aislamiento de Colletotrichum asociado a los síntomas de antracnosis en tejido de hoja y rama, de acuerdo con cada zona de muestreo, Zona de los Santos, San José.

3. Identificación molecular

De acuerdo con los resultados obtenidos en la secuenciación de la región ITS, se obtuvo un total de cinco especies con un porcentaje de similitud de 100% de acuerdo al BLAST realizado, mientras que con la región TEF1 α , se obtuvo en total cuatro especies con un porcentaje de similitud mayor a 97%; mientras que, se presentaron cinco especies afines (aff), con porcentajes entre 89.7% y 97% considerando un porcentaje de cobertura mayor a 70%. Las especies obtenidas se presentan distribuidas en los tres cantones, dichas especies se presentaron tanto en hoja como en rama (Tabla 6).

Tabla 6.

Determinación de especies de Colletotrichum obtenidas con el marcador TEF1 α , e ITS, de acuerdo a cada aislamiento, en tejidos de hoja y rama en el cultivo de café, Zona de los Santos.

Código aislamiento	Localidad	Taxonomía TEF1 α	Porcentaje similitud (%) TEF1 α	Código acceso GenBank TEF1 α	Taxonomía ITS	Porcentaje similitud (%) ITS	Código acceso GenBank ITS
R001-1	León Cortes	C. aff. <i>gloeosporioides</i>	94.97	XM_045409154.1	<i>C. aenigma</i>	100	ON329217.1
R001-2	León Cortes	<i>C. aff. boninense</i>	96.10	GU935842.1	-----	-----	-----
R001-5	León Cortes	<i>C. aff. boninense</i>	95.80	GU935842.1	<i>C. boninense</i>	100	MG832433.1
R002-1	León Cortes	<i>C. aff. boninense</i>	96.18	GU935842.1	<i>C. siamense</i>	100	OP002085.1
R002-3	León Cortes	<i>C. boninense</i>	97.33	GU935843.1	-----	-----	-----
R003-2	León Cortes	C. aff. <i>gloeosporioides</i>	96.56	XM_045409154.1	-----	-----	-----
R003-2	León Cortes	<i>C. aff. aenigma</i>	96.56	XM_037327383.1			
R003-2	León Cortes	<i>C. aff. siamense</i>	96.56	XM_036644039.1			
R003-3	León Cortes	C. aff. <i>gloeosporioides</i>	96.62	XM_045409154.1	<i>C. theobromicola</i>	100	KM505031.1
		<i>C. aff. aenigma</i>	96.62	XM_037327383.1			
R011-2	Tarrazú	<i>C. gloeosporioides</i>	97.52	XM_045409154.1	-----	-----	-----

		<i>C. aenigma</i>	97.52	XM_037327383.1			
R012-4	Tarrazú	<i>C. aff. aenigma</i>	96.69	XM_037327383.1	-----	-----	-----
R013-2	Tarrazú	<i>C. aff. gloeosporioides</i>	94.65	XM_045409154.1	-----	-----	-----
R013-2	Tarrazú	<i>C. aff. aenigma</i>	94.65	XM_037327383.1			
R013-3	Tarrazú	-----	-----	-----	<i>C. aenigma</i>	100	ON329217.1
R013-4	Tarrazú	<i>C. aenigma</i>	97.05	XM_037327383.1	-----	-----	-----
R021-3	Dota	<i>C. sp</i>	-----	GU935846.1	<i>C. cliviicola</i>	100	KY513778.1
R021-4	Dota	<i>C. sp</i>	98.78	GU935846.1	<i>C. cliviicola</i>	100	KY513778.1
R022-1	Dota	<i>C. gloeosporioides</i>	97.89	XM_045409154.1	-----	-----	-----
		<i>C. fructicola</i>	97.89	XM_032019602.1			
		<i>C. aenigma</i>	97.89	XM_037327383.1			
R022-2	Dota	-----	-----	-----	<i>C. aenigma</i>	100	ON329217.1
R022-5	Dota	<i>C. boninense</i>	97.26	GU935842.1	-----	-----	-----
R023-1	Dota	-----	-----	-----	<i>C. aenigma</i>	100	ON329217.1
R023-5	Dota	<i>C. aff. gloeosporioides</i>	96.56	XM_045409154.1	-----	-----	-----
		<i>C. aff. aenigma</i>	96.56	XM_037327383.1			
H001-1	León Cortes	<i>C. aff. boninense</i>	95.58	GU935842.1	<i>C. aenigma</i>	100	ON329217.1 ON329217.1

H001-4	León Cortes	<i>C. aff. boninense</i>	94.46	GU935842.1	<i>C. aenigma</i>	100	ON329217.1
H002-1	León Cortes	<i>C. aff. boninense</i>	94.58	GU935842.1	<i>C. aenigma</i>	100	
H002-5	León Cortes	<i>C. aff. gloeosporioides</i>	92.59	GU935840.1	-----	-----	-----
H003-4	León Cortes	<i>C. gloeosporioides</i>	97.53	XM_045409154.1	-----	-----	-----
		<i>C. aenigma</i>	97.53	XM_037327383.1			
		<i>C. siamense</i>	97.53	XM_036644039.1			
H011-2	Tarrazú	<i>C. aff. gloeosporioides</i>	95.11	XM_045409154.1	-----	-----	-----
		<i>C. aff. aenigma</i>	95.11	XM_037327383.1			
H011-4	Tarrazú	-----	-----	-----	<i>C. theobromicola</i>	100	KM505031.1
H012-1	Tarrazú	<i>C. boninense</i>	97.35	GU935842.1	-----	-----	-----
H012-4	Tarrazú	<i>C. boninense</i>	97.32	GU935842.1	-----	-----	-----
H012-5	Tarrazú	<i>C. boninense</i>	97.29	GU935842.1	<i>C. aenigma</i>	100	ON329217.1
H013-2	Tarrazú	<i>C. aff. gloeosporioides</i>	96.60	XM_045409154.1	<i>C. theobromicola</i>	100	KM505031.1
		<i>C. aff. aenigma</i>	96.60	XM_037327383.1			
H013-4	Tarrazú	<i>C. karstii</i>	98.31	XM_038893648.1	-----	-----	-----
H013-5	Tarrazú	<i>C. aff. boninense</i>	96.34	GU935843.1	<i>C. boninense</i>	100	MG832433.1

H021-2	Dota	-----	-----	-----	<i>C. cliviicola</i>	100	KY513778.1
H021-3	Dota	<i>C. gloeosporioides</i>	97.7	XM_045409154.1			
		<i>C. aenigma</i>	97.7	XM_037327383.1			
H022-1	Dota	<i>C. aff. aenigma</i>	94.65	XM_037327383.1	-----	-----	-----
H022-4	Dota	<i>C. gloeosporioides</i>	97.48	XM_045409154.1	<i>C. theobromicola</i>	100	KM505031.1
		<i>C. aenigma</i>	97.48	XM_037327383.1			
H022-5	Dota	<i>C. aff. gloeosporioides</i>	94.71	XM_045409154.1	-----	-----	-----
H023-1	Dota	<i>C. aff. gloeosporioides</i>	89.73	GU935840.1	<i>C. siamense</i>	100	OM967141.1
H023-3	Dota	<i>C. sp</i>	99.41	GU935846.1	-----	-----	-----

V. DISCUSIÓN

En esta investigación se logró asociar la presencia de ocho especies de *Colletotrichum* con los síntomas de antracnosis normalmente observados en los cafetales de la Zona de Los Santos.

La sintomatología observada (ver [Figura 1](#) y [Figura 2](#)) tanto en rama como en hoja concuerda con lo mencionado por varios autores. Al respecto, Sera et al. (2007), describen manchas necróticas irregulares en los bordes de las hojas y defoliación; así mismo, mencionan color marrón o negro en las ramas y muerte de estas. Dichos síntomas coinciden con los descritos por Gutiérrez et al. (2003), hojas con manchas necróticas generalmente color negro cuando la lesión se encuentra en estado avanzado, esta lesión inicia en el ápice y borde de la hoja y avanza al centro de la lámina foliar, presenta un borde clorótico que separa la lesión de la parte sana; en cuanto a la lesión en rama indican que se caracteriza por necrosis descendente, en un inicio café y conforme el tejido muere se torna gris.

Por otra parte, Rodríguez et al. (2013), mencionan que en hojas se pueden presentar síntomas atípicos, como lesiones circulares por toda la lámina foliar, síntoma que se puede confundir con el provocado por *Cercospora coffeicola*, sin embargo, la lesión por *Colletotrichum* se logra diferenciar por la presencia de un halo café rojizo en el borde de la lesión, seguido por una clorosis.

A pesar de encontrar síntomas similares en los tejidos recolectados, los aislamientos presentaron diferencias morfológicas, mismas que se pueden utilizar para tener un acercamiento a la identificación de una especie, sin embargo, no es certera. Algunos de los aislamientos obtenidos presentan colonias color blanquecino- grisáceo de crecimiento algodonoso, acérvulos anaranjados y en su micromorfología se observaron conidios de forma cilíndrica y micelio hialino, características que coinciden con lo reportado por Cristóbal-Martínez et al. (2017), que indican que la especie *C. gloeosporioides* forma una colonia color blanco a gris claro o gris oscuro, micelio de tipo algodonoso, acérvulos, masas de conidios de color salmón y conidios unicelulares de forma cilíndrica.

De igual forma se obtuvo colonias color verde olivo, con el reverso gris oscuro, y gran cantidad de acérvulos color anaranjado, estas características son similares con la especie *C. theobromicola*, Lima et al. (2019), mencionan que dicha especie puede presentar micelio de color gris oscuro y verdoso, con abundancia de masa de conidios anaranjados, en esta investigación

la identificación molecular indica que el aislamiento H011-4 y H022-4 pertenecen a la especie *C. Theobromicola*, resultados que coinciden con las características macromorfológicas presentadas (ver [Tabla 3](#) y [Tabla 4](#)); sin embargo, aislamientos como H013-2 y R003-3 que de igual forma resultaron *C. theobromicola* no presentan características similares a las mencionadas.

Dentro de otras características se mencionan colonias con crecimiento de micelio tipo algodónoso, color crema con el centro color gris y el reverso de la colonia color crema, Damm et al. (2012), describen a la especie *C. boninense* con un crecimiento de micelio aéreo blanco, y micelio gris en el centro, además describen el reverso de la colonia como un color canela pálido y conidios en masa color salmón; de acuerdo a los resultados obtenidos se observa dicha caracterización en el aislamiento R002-3 (ver [Figura 3](#) cd) y en los aislamientos H001-1, H001-4 y H012-5 (ver [Figura 4](#), ef, gh y op) respectivamente; sin embargo, otros aislamientos identificados como *C. boninense* no coinciden las rasgos descritos por esos autores.

Lo anterior puede deberse a la alta variabilidad morfológica y genética de este patógeno en el cultivo de café (Rodríguez, 2007). Así mismo, Weir et al. (2012), mencionan que muchas características morfológicas pueden sufrir cambios bajo diferentes condiciones de crecimiento, tales como medio de cultivo, temperatura y régimen de luz, de igual forma el subcultivo consecutivo cambia las características morfológicas; debido a esto la importancia de realizar la identificación molecular.

Otra de las características a tomar en cuenta es el tamaño y forma de los conidios; en esta investigación se obtuvo resultados que coinciden con medidas reportadas para el género *Colletotrichum*. En el cantón de León Cortes se obtuvo medias entre 11.47 μm x 3.83 μm y 13.08 μm x 4.35 μm , estas medidas se acercan a lo reportado por Hang et al. (2010), con medidas de 12.8 μm x 4.0 μm , y 15.0 μm x 4.2 μm . Por su parte, Oliva (2009), reporta conidios con medidas de 14.77 μm x 4.63 μm .

En este sentido, Hang et al. (2010), reportan promedios de 14.7 μm x 5,8 μm , medidas similares con las obtenidas en Tarrazú, mientras que Manova et al. (2022), detallan mediciones entre 12.01 μm x 4.7 μm y 21.3 μm x 5.0 μm , medidas que abarcan lo obtenido en Dota, en este cantón se obtuvo los conidios de mayor tamaño, tanto en hoja como en rama. Las localidades en este cantón se encuentran a mayor altitud, lo que podría estar afectando el desarrollo de las estructuras, tal y como lo indican Ngouegni et al. (2022), quienes mencionan que el tamaño de los conidios aumenta cuando aumenta la altitud, debido al cambio en las condiciones climáticas.

De acuerdo con los resultados moleculares obtenidos en la secuenciación de la región ITS, se presentaron cinco especies diferentes, las cuales fueron: *C. aenigma*, *C. boninense*, *C. cliviicola*, *C. siamense* y *C. theobromicola*. Cristóbal-Martínez et al. (2016) y Prihastuti et al. (2009), utilizando los marcados ITS, ACT Y TUB2, han reportado especies de *Colletotrichum* en hojas de café, entre ellas mencionan a *C. siamense*. De igual forma Cerón (2018), en su estudio en el cultivo de café obtuvo a *C. theobromicola* como una de las especies patógenas en el fruto del café utilizando el marcador ITS; además, Cristóbal-Martínez et al. (2018), lo reportan en hojas de café, con la determinación de los marcadores ITS, ACT y β -tubulina.

Por otra parte, Hang et al. (2010), en las especies reportadas en café, con el marcador ITS, mencionan a *C. boninense* presente en las hojas, ramas y frutos de café. Sin embargo, no se tiene registro de la presencia de *C. aenigma* y *C. cliviicola* en el cultivo de café. En cuanto a *C. aenigma*, Weir et al. (2012), menciona que las secuencias ITS, son insuficientes para separar *C. aenigma* y *C. siamense*, donde es mejor utilizar β -tubulina (TUB2) o Glutamina sintetasa (GS). De acuerdo con lo mencionado por Cannon et al. (2012), en *Colletotrichum* la definición de especie basada en la secuencia ITS, ha resultado insatisfactorio, debido a que ese fragmento de gen es evolutivamente conservado para distinguir entre taxones, por lo que deben ser reconocidos utilizando otros genes.

Casi todas las especies obtenidas en esta investigación mediante el análisis molecular con ITS se logran ubicar dentro del complejo *Colletotrichum gloeosporioides*, a excepción de *C. boninense* y *C. karstii*, ya que Weir et al. (2012), menciona que este se compone por 22 especies: *C. aenigma*, *C. aeschynomenes*, *C. alatae*, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C. asianum*, *C. cigarro*, *C. clidemiae*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. horii*, *C. kahawae*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C. psidii*, *C. salsolae*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale* y *C. xanthorrhoeae*.

De estas especies, las reportadas con afectación en el cultivo de café de acuerdo con Cristóbal-Martínez et al. (2016), mediante análisis morfológico y molecular son: *C. acutatum*, *C. asianum*, *C. boninense*, *C. capsisi*, *C. costarricense*, *C. cuscutae*, *C. frigaridae*, *C. fructicola*, *C. gigasporum*, *C. kahawae*, *C. karstii*, *C. siamense* y *C. theobromicola*, así mismo Hang et al. (2020), menciona algunas de estas especies.

Por otra parte, en cuanto a las especies identificadas por medio de la secuenciación de la región TEF1 α , con porcentaje de similitud mayor a 97% en el BLAST, se obtuvo *C. aenigma*, *C. boninense*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, y *C. sp*; mientras que, con un porcentaje entre 89.5%-

97%, se obtuvo las siguientes especies afines: *C. aff. aenigma*, *C. aff. boninense*, *C. aff. fructicola* y *C. aff. gloeosporioides*.

En cuanto a las características morfológicas de las especies obtenidas en esta investigación, su variabilidad podría explicarse de acuerdo con lo mencionado por Weir et al. (2012), autores que han estudiado el complejo *C. gloeosporioides*, e indican que es un clado bien soportado, con pocas diferencias en los genes de los loci estudiados, que comprenden las 22 especies incluidas, sin embargo, presentan diferencias en términos de morfología.

Cristóbal-Martínez et al. (2016), describen a *C. gloeosporioides* como una colonia con una tasa de crecimiento de 7.5 cm después de 10 días, con abundante micelio algodonoso gris oscuro con márgenes blancos y conidios color salmón en el centro de la colonia y el reverso de la colonia color beige con áreas negruzcas, además describe los conidios como cilíndricos con extremos redondeados, con medidas de 14.8 μm x 5 μm , lo que coincide con lo dicho por Torres et al. (2013), quienes reportan medidas similares en conidios para *C. gloeosporioides* de 14.24 μm x 4.02 μm ; sin embargo, se puede presentar variabilidad en el tamaño, por ejemplo, Cerón (2018), obtuvo conidios con medidas de 17.31 μm x 5.03 μm . De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, las medidas obtenidas en las especies clasificadas como *C. gloeosporioides* son similares a las reportadas por estos autores.

Por su parte Damm et al. (2012), mencionan que *C. boninense*, en el pasado era clasificada como *C. gloeosporioides* por su similitud en la forma de los conidios. Dicho autor caracteriza esta especie por un crecimiento de 4-6 cm en 10 días, colonias planas con crecimiento aéreo de micelio blanco, algunas veces presentan el centro grisáceo con el reverso de la colonia color canela pálido, similar a lo obtenido en este trabajo (Figura 4. ab, gh, cd, op), con el tiempo se vuelve rosado pálido, micelio aéreo gris y conidios en masa color salmón. Los conidios se caracterizan por ser hialinos, de paredes lisas, cilíndricos con bases redondeadas, y una medida de 11 μm -14.5 μm x 5- 6 μm . *Colletotrichum boninense* ha sido reportado como endófito en hojas de árboles en Guayana, en cultivos como tamarillo, *Passiflora* y mango en Colombia (Afanador et al., 2003), y en plantas de café en el tejido de hoja, en Colombia y Hawaii (Vega et al., 2010).

Rojas et al. (2010), señalan que *C. theobromicola* se ha registrado principalmente en el cultivo de cacao, Cristóbal-Martínez (2016), indica que en Australia se ha reportado esta especie en el cultivo de café, afectando los órganos de hoja y fruto, y la describe como una colonia de micelio denso algodonoso color gris oscuro con abundantes conidios anaranjados y el reverso de la colonia color gris oscuro, la medida de los conidios en esta especie es de 14.5 μm –18.7 μm x

4.5- 5.5 μm , forma subcilíndrica y clavado, según los resultados obtenidos los conidios medidos ($n=30$) son similares en los aislamientos descritos como *C. theobromicola* (16 μm -17 μm x 4 μm x 5 μm) (Tabla 4, H011-4, H022-4, H013-2).

Prihastuti et al. (2009), indican que la especie *C. fructicola* fue descrita por primera vez en Tailandia, se ha reportado en cultivos como mora y aguacate en Colombia y fue reportado en Tailandia en frutos de café, y en hojas de café en Centro América, las colonias se caracterizan por ser de color blanco a verde oliva con micelio algodonoso, sus conidios presentan un tamaño de 9.7 μm -14 μm x 3 μm -4.3 μm , son hialinos y de forma cilíndrica, con capacidad de presentar fase sexual tipo “*Glomerella*”, los aislamientos afines a *C. fructicola* obtenidos se presentaron en rama y presentan características diferentes a las mencionadas por este autor, ya que son colonias gris claro; sin embargo, el tamaño y forma de conidios sí coincide con lo descrito

Bragard et al. (2022), mencionan que especies como *C. aenigma* y *C. siamense* crecen mejor en temperaturas entre 28°C y 36°C, sin embargo *C. siamense* es más tolerante a temperaturas mayores a 36°C, lo que representa una amenaza para huéspedes que crecen en climas cálidos y lluviosos. Serrato et al. (2020) mencionan colonias color gris claro con micelio aéreo y acérvulos presentes, conidios de 15.2 μm x 4.3 μm de forma cilíndrica y redondeado en ambos extremos, sin embargo, en los resultados obtenidos los conidios son de menor tamaño (12 μm x 4 μm y 13 μm x 4 μm $n=30$).

Colletotrichum karstii, afecta principalmente hoja y fruto en el cultivo del café, ha sido caracterizado por una colonia con micelio blanco a rosado, tipo algodonoso, con abundante micelio oscuro en el centro, y una tasa de crecimiento de 6.5 μm después de 10 días (Cristóbal-Martínez et al., 2016), además presenta conidios cilíndricos, redondeados en el borde con medidas de 10.8 μm -15.5 μm x 5.3 μm -6.8 μm (Fernández et al., 2020) esto coincide con el aislamiento obtenido (Figura 4, w-x), además, se obtuvo una tasa de crecimiento de 6.0 después de 10 días; no obstante, la medida obtenida es mayor que la descrita (16 μm x 5 μm).

En cuanto a la especie *C. aenigma*, no hay estudios de su presencia en el cultivo de café. Bragard et al. (2022), menciona su afectación en cultivos como aguacate, chile, fresa, kiwi, manzana, olivo, pera, pitahaya y planta de té. Zhu et al. (2022), describe las colonias como algodonosas, color blanco y verde grisáceo en el reverso de la colonia y amero conidios, hialinos y cilíndricos, con una medición promedio de 13.9 μm x 5.5 μm ; las características morfológicas de estas colonias son similares a las obtenidas (ver Figura 3, ef y op) y (Figura 4, ef y fg); así mismo, la medida de conidios coincide para el aislamiento R001- 1 (13 μm x 4 μm $n=30$), pero no

así para los aislamientos H022-1 y H022-4 (Tabla 4). Es importante mencionar que en la Zona de los Santos el cultivo de aguacate se encuentra en asocio con el café en la mayor parte de las fincas, por lo que podría existir relación en la presencia de esta especie.

La especie *C. claviicola*, es poco frecuente entre los cultivos, principalmente se encuentra en la planta ornamental *Clivia miniata*, misma que se encuentra en muchos hogares de esta zona, lo que podría tener influencia sobre la presencia de esta especie. Se caracteriza por presentar conidios hialinos, cilíndricos rectos y con una medida promedio de $17.9 \mu\text{m} \times 5.9 \mu\text{m}$, su colonia es de color gris oscuro con micelio aéreo blanquecino y el reverso gris claro, con una tasa de crecimiento de 4 cm en 10 días y una masa de conidios color blanquecino (Damm et al., 2019); de acuerdo a los resultados obtenidos los aislamientos R021-3 y R021-4 (Tabla 3), si presentan conidios con medidas similares ($17 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ y $16 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$, $n=30$), sin embargo las características morfológicas no coinciden con lo descrito.

Las especies encontradas, fueron recuperadas de lesiones tanto de hoja como de rama, y las mismas varían de acuerdo con la zona de muestreo, los aislamientos realizados presentan diferencias morfológicas principalmente en el color, ya que la mayoría presentó un crecimiento algodonoso, de igual forma el tamaño de los conidios presento diferencias entre las especies, *C. fructicola* presentó conidios de menor tamaño, mientras que *C. claviicola* y algunos aislamientos de *C. gloeosporioides* presentaron mayor tamaño.

La afectación de antracnosis en hojas y ramas en café disminuyen el rendimiento de una plantación, ya que la pérdida de área foliar genera una interferencia con la fotosíntesis, lo que afecta la cantidad final en fruta, así mismo las ramas afectadas generan menor cantidad de área productiva por planta (Avelino et al., 2018), además estos tejidos pueden ser fuente de inóculo para los frutos; el estudio de las especies de *Colletotrichum* presentes en café en la Zona de los Santos y la capacidad de infección a los diferentes tejidos de la planta permite determinar la importancia de estos patógenos.

El estudio de *Colletotrichum* en café es muy reducido o al menos no se encuentra publicación alguna respecto a las especies que afectan cada una de las regiones cafetaleras de Costa Rica, siendo esta la primera investigación donde se estudió la diversidad de especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en rama y hoja en café en la Zona de los Santos.

Los resultados de esta investigación muestran ocho especies de *Colletotrichum* presentes en lesiones de antracnosis en ramas y hojas en el cultivo de café en la Zona de los Santos, dicha información es una línea base para la generación de nuevos datos, tal como patogenicidad de

las especies y eficacia en el control de productos utilizados para el manejo de la enfermedad, ya sean químicos o biológicos.

VI. CONCLUSIONES

- La investigación permitió conocer la diversidad de especies de *Colletotrichum*, asociadas a síntomas de antracnosis en rama y hoja del café.
- Se obtuvo un acercamiento a las especies presentes en la Zona de los Santos, sin embargo, no fue posible resolver del todo las especies presentes con el uso de ITS y TEF1 α .
- La determinación de una especie no se puede realizar en forma definitiva mediante la caracterización morfológica, debido a la variabilidad que se presenta, por lo que estrictamente se debe realizar la identificación a través de procesos moleculares, con diversos marcadores.
- La selección adecuada del marcador a utilizar de acuerdo con la especie en estudio es de suma importancia en la obtención confiable de resultados.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda generar mayor cantidad de aislamientos por finca y muestrear más localidades.
- Debido a que se determinaron dos especies no reportadas en el cultivo de café (*C. cliviicola* y *C. aenigma*), las cuales estarían asociadas a síntomas de antracnosis en hoja y rama de café en Costa Rica, es importante realizar el estudio con otros marcadores (β -tubulin (tub2), gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GPDH) Y Actino (ACT)), así como pruebas de patogenicidad.
- En la medida de lo posible llevar a cabo el proceso en el mismo laboratorio, esto con el fin de evitar la contaminación cruzada.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abarca, R. (2017). *Estudio del proceso de torrefacción del café (Coffea arabica) en tostador convencional*. [Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica]. 124 p.
- Afanador, L., Minz, D., Maymon, M., & Freeman, S (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, 93 (5), 579–587. DOI: 10.1094/PHYTO.2003.93.5.579
- Alarcón Restrepo J., & Chavarriaga Montoya, W. (2007). Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. *Agronomía*, 15 (1), 89-102. <https://biblat.unam.mx/es/revista/agronomia-manizales/articulo/diagnostico-precoz-de-la-antracnosis-colletotrichum-gloeosporioides-penz-penz-sacc-en-tomate-de-arbol-mediante-el-empleo-de-infecciones-quiescentes>
- Angarita Merchan, M., Torres Caicedo, M., & Diaz Torres, A. (2017). Técnicas de biología molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16 (5), 796- 807. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/1651/1867>
- Arguedas Gamboa, M., & Cots Ibiza, J. (2012). La antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en viveros forestales. *Revista Forestal Mesoamericana*, 9 (22), 60-62. Doi.org/10.18845/rfmk.v9i22.364
- Avelino, J., Allinne, C., Cerda, R., Willocquet, L., & Savary S. (2022). Multiple disease system in coffee: from crop loss assessment to sustainable management. *Annual Review of Phytopathology* 56 (1), 611- 635.
- Bogantes Arias, A., & Mora Newcomer, E. (2013). Incidencia y severidad de la antracnosis en líneas e híbridos de papaya (*Carica papaya*). *Agronomía Mesoamericana*. 24(2): 35-39. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212013000200017.
- Bragard, C., Baptista P., Chatzivassiliou, E., Di Serio, F., Gonthier, P., Jaques, JA., Justesen, AF., MacLeod, A., Magnusson, CS., Milonas, P., Navas, JA., Parnell, S., Potting, R., Reignault, PL., Stefani, E., Thulke. HH., Van der Werf, A., Yuen. J., Zappala, L., Migheli, Q.,

- Vloutoglou, L., Czwienczek, E., Maiorano, A., Streissl, F., & Reignault, PL. (2022). Pest categorisation of *Colletotrichum aenigma*, *C. alienum*, *C. perseae*, *C. siamense* and *C. theobromicola*. *EFSA Journal*, 20 (8), 1-80. Doi: 10.2903/j.efsa.2022.7529
- Brunner, C., Navarro Barranco, H., Ayala Zermeño, M., Mellin Rosas, MA., & Toriello, C. (2013). Obtención y caracterización de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) para genotipificación. Departamento de microbiología y parasitología. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México. 3p.
- Cannon, P., Damm, U., Johnston, P., & Weir, B. (2012). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73 (1), 181-213. Doi:10.3114/sim0014
- Cerón, Y. (2018). Morfología y patogenicidad de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en el cultivo de café en la finca San Pedro, Santa Ana, El Salvador. [Tesis de licenciatura. Universidad de El Salvador]. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/19717/>
- CIP (Centro Internacional de la Papa). (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; 62 p. <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Contreras, C. (2006). *Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de Colletotrichum spp. Obtenidos de frutos de lulo (Solanum quitoense Lam), tomate de árbol (Solanum betacea Sendt), granadilla (Passiflora ligularis Juss), mango (Mangifera indica L) y tallos de mora (Rubus glaucus Benth) con síntomas de antracnosis*. [Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana] <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8253/tesis239.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cordero Méndez, G. (2017). *Eficiencia de control de la roya del cafeto (Hemileia vastatrix) con triazoles y estrobilurinas en el Rosario de Naranjo Costa Rica*. [Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica].
- Crespo, R., Douthat, T., & Pringle, C. (2020). Stream friendly coffee: evaluating the impact of coffee farming on high-elevation streams of the Tarrazú coffee region of Costa Rica. *Hidrobiología*, 847 (1), 1903-1923. Doi.org/10.1007/s10750-020-04221-1

- Cristóbal Martínez, A., Yáñez Morales, M., Solano Vidal R., Segura León, O., & Hernández Anguiano, A. (2017). Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, 147 (3), 605-614. Doi:10.1007/s10658-016-1029-0
- Damm, U., Cannon, P., Woudenberg, J., Johnston, P., Weir, B., Tan, Y., Shivas, R., & Crous P. (2012). The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*, 73 (1), 1-36. Doi:10.3114/sim000
- Damm, U., Sato, T., Alizadeh, A., Groenewald, J., Crous, P. (2019). The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. *Studies in Mycology*. 92 (1), 1-46. Doi: doiorg.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/10.1016/j.simyco.2018.04.001
- Dean, R., Van, J., Pretorius, Z., Hammond, K, Di Pietro, A., Spanu, PD., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann R., Ellis, J., & Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathology*, 13 (4), 414-30. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2011. 00783.x
- Escudero, E., Alfaro, P., Muñoz, R., Charpentier, C., Granados, M., Valverde, K., Pérez, M., Méndez, M., Rodríguez, C., Chaverri, P., & Mora, A. (2022). Tolerance and biological removal of fungicides by *Trichoderma* species isolated from the endosphere of wild Rubiaceae Plants. *Frontiers in Agronomy*, 3, 1-14. Doi.org/10.3389/fagro.2021.772170
- Fernández, E., Rentería, M., Ramírez, I., Moreno, S., Ochoa, A., & Guillen, D. (2020). *Colletotrichum karstii*: causal agent of anthracnose of *Dendrobium nobile* in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 42 (1), 514- 519. Doi.org/10.1080/07060661.2020.1731711
- Gan, P., Narusaka, M., Kumakura, N., Tsuschima, A., Takano, Y., Narusaka, Y., & Shirasu, K. (2016). Genus-wide comparative genome analyses of *Colletotrichum* species reveal specific gene family losses and gains during adaptation to specific infection lifestyles. *Genome Biology and Evolution*, 8 (5), 1467- 1481. Doi.org/10.1093/gbe/evw089
- Gil Vallejo, L. (2003). *Descripción de daños ocasionados por Colletotrichum en flores y frutos de café en Colombia*. Ficha técnica. Centro de investigación de café (CENICAFE). Colombia.

- Gil Vallejo, L., Varzea, V., Silva, M. (2002). La enfermedad de las cerezas del café (CBD), ocasionada por el hongo *Colletotrichum kahawae*. *Centro Nacional de Investigaciones de Café* (Cenicafé).
file:///C:/Users/Usuario/Downloads/AvancestcnicosCenicaf2002%20(4).pdf
- Gutiérrez Alfaro, A. (2018). *Determinación del efecto de la mezcla de triazoles con fosfitos sobre el desarrollo de la roya anaranjada (Hemileia vastatrix) y el rendimiento del cultivo de café (Coffea arabica), variedad Catuaí*. [Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica].
<http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/7524>
- Gutiérrez, Y., M, Barrios., P, Moraga., & Monzón, A. (2003). Antracnosis, seria amenaza. Boletín informativo n°2: Grupo Café Nicaragua. Managua, Nicaragua.
- Hang, P., Vinnere, O., Olsson, P., & Liljeroth, E. (2010). Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. *European Journal of Plant Pathology*, 127 (1), 73-87. Doi:10.1007/s10658-009-9573-5
- Hernández Aguilar, J. (2010). Incidencia de enfermedades foliares del café bajo diversos tipos de sombra y manejo de insumos en sistemas agroforestales, Turrialba, Costa Rica. [Tesis de Grado. Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://hdl.handle.net/2238/5723>
- Hindofor, H., & Omondi, C. (2010). A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of Advances Research*, 2 (1), 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.08.006>
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). (2011). Guía técnica para el cultivo de café. Heredia, Costa Rica: CICAFFE.
- ICAFE (Instituto del café de Costa Rica). (2015). Tarrazú. Consultado el 13 de mayo de 2020. Disponible en <http://www.icafe.cr/nuestro-cafe/regiones-cafetaleras/tarrazu/>.
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). (2017). Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. Heredia, Costa Rica.
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). (2019). Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. Heredia, Costa Rica. 111p.

- Ishikawa, F., Barcelos, Q., Alves, E., Camargo, O., & Souza, E. (2010). Symptoms and prepenetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. *Journal Phytopathology*, 158 (4), 270–277. Doi: 10.1111/j.1439-0434.2009.01608.x
- Lima, N., Pastor, S., Maza, C., Conforto, C., Vargas, S., & Roca, M. (2019). First Report of Anthracnose of Olive Fruit Caused by *Colletotrichum theobromicola* in Argentina. *Plant disease*, 104 (2), 589. Doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1207-PDN
- Manova, V., Stoyanova, Z., Rodeva, R., Boicheva, I., Korpelainen H., Vesterinen, E., Wirta, E., & Bonchev, G. (2022). Morphological, Pathological, and Genetic Diversity of *Colletotrichum* Species Pathogens on Solanaceous Vegetable Crops in Bulgaria. *Journal of fungi*, 8, 1123. Doi.org/10.3390/jof8111123.
- Molina Chávez, A., Gómez Alpízar, L., Umaña Rojas, G. (2017). Identificación de especies del género *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.) en Costa Rica. *Agronomía costarricense*, 41(1), 69-80. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v41n01_069.pdf.
- Mora, N. (2008). Agrocadena de Café. Región Huetar Norte: Ministerio de agricultura y Ganadería. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-9314.pdf>
- Moral Moral, J., Trapero Casas, A. (2009). Resistencia del olivo a la antracnosis causada por *Colletotrichum* sp. Boletín de Sociedad Española de *Hidrología Médica*. 66. 22-30.
- Ngouegni, Y., Numbo, T., Kamdoum, K., Samuel, B., & Francois, N. (2022) Influence of altitudes on the cultural and morphological variation of *Colletotrichum kahawae* isolates, the causal agent of coffee berry disease in the West Region of Cameroon. *African Journal of Agricultural Research*, 18 (11), 898- 906. Doi: 10.5897/AJAR2022.16089
- Oliva, P. (2009). *Caracterización morfológica, patogénica y bioquímica de aislamientos de Colletotrichum spp. asociados al cultivo de café (Coffea arabica) en Guatemala*. [Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala]. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/8959/>

- Pérez- León, G., Chavarría- Pérez, L., Araya- Quesada, J., & Gómez- Alpízar, L. (2013). Identificación del agente causal de la antracnosis en *Sansevieria* sp. En Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 37(1), 39-50. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0377-94242013000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Pérez, N., Kurumae, E., Díaz, M., & De Souza, N. (2002). Identification and characterization of *Colletotrichum* spp., affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal. Phytopathology*, 150 (1) 128-134. <https://web-p-ebsochost.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=18f3dd62-fa8b-49aa-b95f-e73d2307e591%40redis>
- Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., Mckensi, E., & Hyde, K. (2009). Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity*, 39 (1), 89-109. <https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-4-E.pdf>
- Quintero Rizzuto, M., & Rosales M. (2014). El mercado mundial del café: tendencias recientes, estructura y estrategias de competitividad. *Visión Gerencial*, 2(1), 271-307. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=465545897005>
- Restrepo Salazar, J., Sánchez López, R., Gallego Beltrán, J., & Soto Rave, C. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo de cítricos, medidas para la temporada invernal. ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). Bogotá, Colombia. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/2288>
- Reyes Diaz, D. (2006). *Evaluación de alternativas para el manejo de antracnosis (Colletotrichum sp.), en el cultivo de café (Coffea arabica L), en fincas de los departamentos de Carazo, Granada y Masaya*. [Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/1996/>
- Rodríguez López, E., Cárdenas Soriano, E., Hernández- Delgado, S., Gutiérrez Diez, A., & Mayek Pérez, N. (2013). Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Brasileira de fruticultura*, 35 (3), 898- 905. <https://www.scielo.br/j/rbf/a/3m6hHrsPpdKxZXb6bBw3qyF/?lang=es&format=pdf>
- Rodríguez, A. (2007). *Caracterización molecular de poblaciones de Colletotrichum spp. asociadas a Coffea arabica en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD*. [Tesis de grado.

Pontificia Universidad Javeriana].
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8959/tesis18.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rojas, I., Rehner, S., Samuels, J., Van Bael, S., Herre, E. A., Cannon, P. F., Chen, R., Pang, J., Wang, R., Zhang, Y.Q., & Sha, T. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish pathogen and endophyte clades. *Mycologia*, 102 (6), 1318–1338.

Rojo Báez, I., Álvarez Rodríguez, M., García Estrada, R., León Félix, J., Sañudo Barajas, A., Allende- Molar, R. (2017). Current status of *Colletotrichum* spp. in México: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control. *Mexican Journal of Phytopathology*. 35(3): 549-570. Doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-9

Rojo Báez, I., García Estrada, R., Sañudo Barajas, J., León Félix, J., & Allende Molar, R. (2017). Proceso de infección de antracnosis por *Colletotrichum truncatum* en papaya Maradol. *Brasileira de fruticultura*, 39 (1), 1-5. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017379>

Roskov, Y., Ower, G., Orrell, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., DeWalt, R., Decock, W., Nieukerken, E., & Penev, L. (2020). *Colletotrichum*. Royal Botanic. Consultado el 18 de setiembre de 2020. Disponible en <https://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/2bf893e846bf0cd120fc9cbbd18957fb>

Salazar, E., Hernández, R., Tapia, A., Gómez Alpízar, L. (2012). Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* sp., aislado de banano (*Musa* sp.) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas postcosecha. *Agronomía Costarricense*, 36(1), 53-68. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/ac/v36n1/a04v36n1.pdf>

Sera, G., Sera, T., Ito D., Azevedo, J., Ribeiro, C., & Mata, J. (2007). Partial resistance to fruit necrosis associated to *Colletotrichum* spp. among Arabic Coffee genotypes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50 (3), 395-402. <https://www.scielo.br/j/babt/a/HypqHwWDpHGNSn3Cv4yPdGh/?format=pdf&lang=en>

Serrato, L., Mariño, Y., & Bayman, P (2020). Pathogens Causing Anthracnose and Fruit Rots of Coffee Associated with the Coffee Berry Borer and the Entomopathogenic

Fungus *Beauveria bassiana* in Puerto Rico. *Phytopathology*, 110 (9), 1541-1552.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0057-R>

Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2014).
Antracnosis del cafeto *Colletotrichum kahawae*. Ficha técnica N°42. México. 17.

Silva, B., Jaramillo, S., & Marín, M. (2009). Caracterización genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en las zonas productoras de papa de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Norte de Santander (Colombia). *Actualidades Biológicas*, 31 (90) 5-20. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-35842009000100001&script=sci_abstract&tIng=es

Solórzano, G. (2004). Exportadores y consignatarios del café costarricense a finales del siglo XIX. *Historia*, 50(1), 59-109.
<https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/historia/article/view/1783>.

Timmer, W., Adaskaveg, E., Correl, C. (2005). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant disease*, 89 (8), 784-796. Doi: [org/10.1094/PD-89-0784](https://doi.org/10.1094/PD-89-0784)

Torres, C., Tapia, R., Higuera, I., & Pérez, D. (2013). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *Eur J Plant Pathol*, 135, 67–79. Doi: [10.1007/s10658-012-0065-7](https://doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7).

Valdés, L., Calero, D., Gómez, A., Carballo, M., Capote, M; Gonzales, I., & Alvares J. (2017). Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de *Colletotrichum* sp. produciendo antracnosis en mango (*Mangifera indica* L). *Ciencias de la vida*, 26 (2), 38-51. 96. Doi: [org/10.17163/lgr.n26.2017.04](https://doi.org/10.17163/lgr.n26.2017.04).

Vega, F., Simpkins, A., Aime, M., Posada, F., Peterson, SW., Rehener, S., Infante, F., Castillo, A., & Arnold, E. (2010). Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawaii, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, 3 (3), 122–138. Doi: [org/10.1016/j.funeco.2009.07.002](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.07.002)

Vieira, W., Nascimento, RJ., Michereff, SJ., Hyde, KD., & Camara, PS. (2013). First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. *Plant Disease*, 97 (12), 1659. Doi:[org/10.1094/PDIS-05-13-0520-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0520-PDN).

Vignola, R., Watler, W., Poveda Coto, K., & Vargas Cespedes, A. (2018). Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en el cultivo de café en Costa Rica. Ficha técnica. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). Turrialba, Cartago. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-8206.pdf>

Weir, B., Johnston, P., Damm, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. (2012). *Studies in Mycology*, 73 (1), 115-180. Doi:10.3114/sim0011.

Zhu, Z., Dong, Z., Mo, R., Zhang, C., Zuo, Y., Yu, C., & Hu, X. (2019). First report of leaf anthracnose caused by *Colletotrichum cliviicola* on hybrid Pennisetum in China. *Plant disease*. 103 (9). Doi: doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0386-PDN

ANEXOS

Anexo 1

Datos generales de la extracción de ADN.

Identificación	Nombre	Concen Ácido nucleico
blanco	Molecular	0,2
blanco	Molecular	1,2
blanco	Molecular	0,5
Blanco (Reblank)	Molecular	0,1
blanco	Molecular	-0,1
H001-3	Molecular	2419,9
H001-1	Molecular	2654,1
H001-4	Molecular	707,6
H002-5	Molecular	859,6
H002-1	Molecular	728,2
H003-4	Molecular	1350,7
H003-1	Molecular	493,3
H011-4	Molecular	387
H011-1	Molecular	48,1
H011-1	Molecular	48
H011-3	Molecular	4,4
H011-3	Molecular	4,6
H012-5	Molecular	39,1
H012-1	Molecular	1211,7
H012-4	Molecular	1165,5
H013-2	Molecular	211,4
H013-2	Molecular	212,1
H013-4	Molecular	105,4
H013-5	Molecular	395,3
H021-3	Molecular	194,4
H022-3	Molecular	1521,2
H022-4	Molecular	635,9
H022-1	Molecular	540,9
H023-4	Molecular	167,1
H023-4	Molecular	163,1
Blanco	Molecular	0,4
R013-3	Molecular	60,4
R003-2	Molecular	30,4
R003-4	Molecular	141,3
R002-1	Molecular	80,6
R002-3	Molecular	345,3
R001-2	Molecular	255,1
R001-5	Molecular	74,9
R001-1	Molecular	218,8
R011-2	Molecular	99,1
R011-4	Molecular	181,6
R011-4	Molecular	179,3
R012-5	Molecular	334,1
R012-5	Molecular	477,9

R012-4	Molecular	210,4
R012-1	Molecular	111,4
R013-4	Molecular	57,2
R013-2	Molecular	327,6
R022-4	Molecular	198,2
R022-5	Molecular	695,5
R022-2	Molecular	215,3
R023-5	Molecular	26,1
R023-5	Molecular	363,1
R023-1	Molecular	360,6
H011-2	Molecular	152,6
R013-3	Molecular	159,4
H023-5	Molecular	157,5
H003-5	Molecular	163,2
H022-5	Molecular	360
R021-3	Molecular	80,9
R022-1	Molecular	300,7
R021-4	Molecular	141,4
R021-2	Molecular	227
H021-2	Molecular	160,6
H023-1	Molecular	481,2
H023-3	Molecular	125,2

Anexo 2.

Sintomatología en campo, afectación rama y hoja

**Anexo 3.**

Sintomatología en campo, afectación frutos.

