

## IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL HONGO *Colletotrichum* spp., AISLADO DE BANANO (*Musa* spp) DE ALTURA EN LA ZONA DE TURRIALBA Y DETERMINACIÓN DE SU SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS POSCOSECHA

Eduardo Salazar<sup>1</sup>\*, Ramses Hernández<sup>\*\*</sup>, Ana Tapia<sup>\*\*\*</sup>, Luis Gómez-Alpizar<sup>\*\*\*\*</sup>

**Palabras clave:** Antracnosis, PCR, poscosecha, tiabendazole, imazalil, miclobutanil.

**Keywords:** Anthracnose, PCR, postharvest, thiabendazole, imazalil, miclobutanil.

Recibido: 12/10/11

Aceptado: 12/04/12

### RESUMEN

La antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum* spp., es una de las principales enfermedades poscosecha que afectan el fruto del banano. En el presente experimento, 25 aislamientos de *Colletotrichum* spp., obtenidos de frutos de banano provenientes de 5 zonas del cantón de Turrialba, Costa Rica, fueron utilizados para caracterizar molecularmente al hongo y evaluar su sensibilidad in vitro a 3 fungicidas poscosecha: tiabendazol, imazalil y miclobutanil. La identificación molecular de cada uno de los aislamientos se realizó mediante la técnica PCR con los imprimadores especie-específicos de la región ITS (CgInt/ITS5) y de una región del gen de la  $\beta$ -tubulina (TBCG/ TB5). Para las pruebas de sensibilidad in vitro a los 3 fungicidas, se utilizaron las siguientes concentraciones: 0,1; 1,0; 10,0 y 100,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . El análisis de la región ITS y de la región del gen de la  $\beta$ -tubulina, indicó que los aislamientos analizados corresponden a la especie *Colletotrichum gloeosporioides*. En cuanto a las pruebas de sensibilidad in vitro, todos los aislamientos fueron sensibles al tiabendazol, mientras que existe una marcada insensibilidad al imazalil y al miclobutanil.

### ABSTRACT

**Molecular identification of the fungus *Colletotrichum* spp., isolated from banana (*Musa* spp) in high lands from Turrialba and determination of their sensitivity to postharvest fungicides.** Anthracnose is one of the most serious banana post-harvest diseases. A total of 25 *Colletotrichum* isolates were obtained from banana fruits grown in 5 areas in Turrialba County, Costa Rica; 5 isolates per area. Isolates were characterized on the basis of polymerase chain reaction (PCR) using species-specific primers of the ITS region and  $\beta$ -tubulin, gene, and their in vitro sensitivities to the fungicides thiabendazole, imazalil and myclobutanil at 0.1, 1.0, 10.0 y 100.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . All isolates were identified as *Colletotrichum gloeosporioides* and were sensitive to thiabendazole, whereas most isolates showed a marked reduction in sensitivity to imazalil and myclobutanil.

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: esalazar@biotek-agriculture.cr

\* Biotek Agriculture Latinoamérica. San José, Costa Rica.

\*\* Plant Pathology and Postharvest. Tropical Fruit.

\*\*\* Laboratorio de Fitopatología. Sede del Atlántico, Universidad de Costa Rica. Turrialba, Costa Rica.

\*\*\*\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo del banano (*Musa* spp) es una fuente importante de trabajo e ingresos en los países donde se produce. En Costa Rica, el banano se cultiva en forma comercial en zonas de alta precipitación y temperatura promedio de 30°C, ubicadas hasta los 300 msnm. Actualmente existe interés en la producción de banano en áreas localizadas a mayores altitudes, entre 440 y 1300 msnm (banano de altura), ya que la fruta tiene un sabor más dulce (A. Tapia 2009. Comunicación personal, Ramírez 2010); esto debido a que su ciclo de producción es más prolongado y se da una mayor acumulación de almidones que posteriormente son desdoblados en azúcares durante la maduración. Adicionalmente puede haber una mayor acumulación de fructosa que es 5 veces más dulce que la glucosa. La fruta proveniente de estas áreas podría comercializarse en los mercados como un producto diferenciado, eventualmente a un mayor precio. Junto con la mejora en el sabor de la fruta, también se busca que sea producida bajo un esquema de reducción o no uso de fungicidas, dada la preferencia creciente de los consumidores por productos obtenidos sin el uso de agroquímicos. Sin embargo, la fruta producida bajo este esquema de no uso de agroquímicos, puede presentar mayores daños por patógenos en poscosecha, favorecidos por la edad de cosecha y por el tiempo transcurrido desde su cosecha hasta alcanzar el mercado final de destino (Alvinda y Natsuaki 2008). En Costa Rica, la información disponible para banano de altura sobre los daños poscosecha y los patógenos asociados es limitada.

La antracnosis es una de las principales enfermedades poscosecha del banano e influye significativamente en la calidad de la fruta mercadeable. Los síntomas se presentan como lesiones ovaladas, oscuras y hundidas, con presencia de acérvulos (masas de esporas). La infección del fruto ocurre normalmente en campo durante su desarrollo; pero permanece latente hasta que el fruto madura (Raut y Ranade 2004), por lo que los síntomas se manifiestan mayormente durante el almacenamiento y muchas veces en los supermercados. La antracnosis es más severa si el

fruto sufre heridas o lesiones como resultado de un mal manejo de la fruta.

*Colletotrichum musae* (Berk and Curtis) Arx ha sido considerada la especie causante de la antracnosis en banano con base en descripciones morfológicas y el alto grado de especificidad por el hospedante. Sin embargo, existe evidencia que aislamientos de *Colletotrichum* provenientes de un mismo hospedante pueden pertenecer a diferentes especies, por lo que el criterio de especificidad por hospedante para la identificación del agente causal de la enfermedad es inapropiado y genera confusión (Peres et al. 2002, Lima et al. 2003, Hernández 2009, Jeger et al. 1995, Phoulivong et al. 2010). Una variabilidad morfológica y patogénica entre aislamientos de *C. musae* ha sido observada y se ha demostrado la existencia de razas fisiológicas o biotipos (Moriwaki et al. 2002, Peres et al. 2002, Ureña et al. 2002, Guerber et al. 2003, Liu et al. 2007). Análisis filogenéticos recientes indican que *C. musae* y *C. gloeosporoides* son conspecíficas; es decir una misma especie (Du et al. 2005, Hernández 2009). Phoulivong et al. (2010) determinaron que aunque *C. gloeosporoides* y *C. acutatum* han sido consideradas las especies responsables de la antracnosis en frutos tropicales, ninguna de estas especies fue identificada como el agente causal de la enfermedad en Laos y Tailandia. Su estudio incluyó 25 aislamientos provenientes de guayaba, mango, papaya, y banano, entre otros.

Actualmente, el combate de la antracnosis en banano se basa en la aplicación de fungicidas poscosecha; específicamente el tiabendazol e imazalil (Villalta et al. 2006, Guzmán y Villalta 2008), así como la implementación de prácticas culturales en campo y en la planta empacadora para la reducción del inóculo. Otros 2 fungicidas registrados para uso poscosecha en banano son el miclobutanil y la azoxistrobina (Villalta et al. 2006, Guzmán y Villalta 2008).

Estos fungicidas son considerados de sitio específico, e inhiben un proceso particular del metabolismo del patógeno. El uso de fungicidas de este tipo enfrenta el problema de la selección

de individuos resistentes en la población del patógeno blanco (Hernández 2009), que resulta en una disminución en la eficacia de los productos y una pérdida de esta estrategia de combate.

El cantón de Turrialba, provincia de Cartago, posee las condiciones agroclimáticas, así como disponibilidad de mano de obra, vías de comunicación, cercanía a un puerto, entre otras, que le confieren el potencial para la producción de banano de altura. En la zona existen algunas plantaciones de banano con las variedades Gros Mitchel y Congo.

El objetivo de esta investigación fue determinar la(s) especie(s) de *Colletotrichum* asociada(s) con la antracnosis en frutos de banano (*Musa* spp) de altura en el cantón de Turrialba y su sensibilidad a los fungicidas tiabendazol, imazalil y miclobutanil.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

En la presente investigación se recolectaron racimos de banano de las variedades Gros

Michel y Congo en 5 zonas del cantón de Turrialba, Cartago, ubicadas entre los 440 y los 1160 msnm; por lo que se considera banano de altura (Cuadro 1).

Los racimos recolectados tenían un calibre entre 38 y 40 32avos de pulgada en el dedo central de la segunda mano de arriba hacia abajo. Una vez seleccionados, los racimos se “desmanaron” y empacaron en bolsas plásticas con papel húmedo en su interior y luego se colocaron en cajas plásticas para su transporte. Cada caja se identificó con la zona de procedencia y la fecha de muestreo. Las cajas plásticas se colocaron en una cámara de almacenamiento con una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 95% con la finalidad de promover la maduración natural de los frutos y la aparición de los síntomas de la enfermedad. Las cajas se revisaron cada 2 días para verificar la presencia de signos (acérvulos) del patógeno. Los aislamientos se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Costa Rica Sede del Atlántico (Turrialba). Se escogieron 5 aislamientos para cada una de las 5 zonas del cantón de Turrialba, provincia de Cartago (Figura.1).

Cuadro 1. Zonas productoras de banano de altura en el cantón de Turrialba, Cartago, donde se obtuvieron los frutos para la investigación.

Zonas	Productor	Altura (msnm)
Grano Oro	Alfredo Arias Jiménez	1160
Piedra Redonda	Julio Gómez Sánchez	920
Celulosa	Víctor Morales	440
San Juan Sur	Alonso Obando	900
Atirro (Feima)	Sede del Atlántico	546

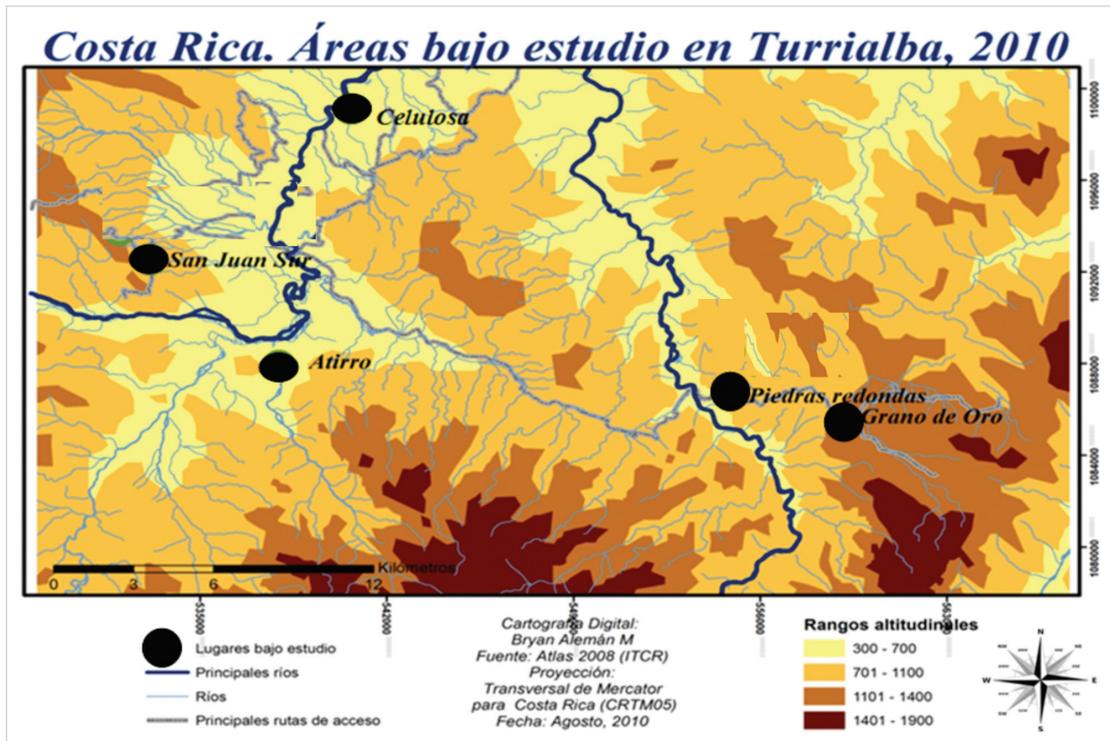


Fig. 1. Mapa de algunas de las zonas productoras de banano de altura en el cantón de Turrialba, Cartago (Ramirez 2010).

### Obtención de aislamientos monospóricos

Con ayuda de una aguja de disección estéril se rasparon las lesiones sobre la cáscara de los frutos de banano que presentaban una cantidad visible de acérvulos y se colocó el raspado en un erlenmeyer con 25 ml de agua destilada estéril. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l y se colocó en una caja Petri con medio de cultivo Agar-Agua (Bacto<sup>IM</sup> Agar. Difco, Le Pont de Claix, Francia) enmendado con 0,5 g.l<sup>-1</sup> de cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias.

La suspensión de esporas se distribuyó sobre la superficie de la caja Petri con ayuda de un asa, con el fin de que las esporas quedaran suficientemente separadas. Posteriormente, las cajas Petri se colocaron en una incubadora por 14 h aproximadamente, a una temperatura de 24°C. Transcurrido este tiempo y con ayuda de

un estereoscopio se identificaron las esporas ligeramente germinadas y se procedió a transferir las esporas individuales a nuevas cajas Petri con el medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar, PDA. Difco, Le Pont de Claix, Francia) enmendado con cloranfenicol 0,5 g.l<sup>-1</sup> para evitar el crecimiento bacterial. Una espora por caja Petri. Las cajas Petri se colocaron en una incubadora con una temperatura entre 24 y 26°C por 8 días.

### Identificación molecular

#### Extracción de ADN del hongo

La extracción de ADN se hizo a partir del micelio de cada uno de los 25 cultivos monospóricos (monoconidiales) obtenidos. La extracción del ADN se realizó mediante el protocolo

descrito por Rogers y Bendich (1988) con algunas modificaciones.

### Identificación de especies mediante imprimadores específicos

Para la identificación de las especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis de banano de altura se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación con imprimadores o iniciadores específicos de 2 regiones genómicas: 1. la región de los espaciadores internos transcritos, ITS (Internal Transcribed Spacers, ITS1-5.8S-ITS2, por sus siglas en inglés), del ADN ribosomal (ADNr) y 2. una porción del gen de la  $\beta$ -Tubulina 2.

Para la amplificación de la región ITS se usaron los imprimadores CgInt (5'GGCCTCC-CGCCTCCGGGCGG3') para *C. gloeosporioides* y CaInt2 (5'GGGGAAGCCTCTCGCGG3'), para *C. acutatum*, combinados con el imprimador universal ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). Las combinaciones de imprimadores fueron CgInt e ITS4 y CaInt2 e ITS4 (Sreenivasaprasad et al. 1996), respectivamente. La porción del gen de la  $\beta$ -Tubulina 2 se amplificó con los imprimadores específicos TBCG (*C. gloeosporioides*, 5'CGGAAGCCTGGGTAGGAGCG 3') y TBCA (*C. acutatum*, 5'CGGAGGCCTGGTTGGGTGAG 3'), combinados con el imprimador TB5 (5'GGTAACCAGATTGGTGCTGCCTT3') (Valero et al. 2010). Cada par de imprimadores se empleó de manera independiente.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25  $\mu$ l, la mezcla consistió en: 2,5  $\mu$ l de Dreamtaq buffer 10X, 1,6  $\mu$ M de cada imprimador, 1,7 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM de dNTPs, 0,4 mg.ml<sup>-1</sup> BSA, 1,5 U Taq Polimerasa (Fermentas), aproximadamente 30 ng de ADN molde y agua nanopura estéril. La amplificación se realizó en un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler con el siguiente programa térmico (ITS/  $\beta$ -Tubulina): desnaturalización inicial a 94°C por 3/5 min; 25/30 ciclos de desnaturalización a 94°C, por 30/45 s, alineamiento a 57°C/62°C por 60/30 s; extensión inicial a 72°C por 45/120 s; y una extensión final de 72°C por

5/7 min. En todos los casos se incluyó controles positivos para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, así como un control negativo (sin ADN). El producto de PCR se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en 0,5X TBE buffer (Tris 10mM, Borato 20 mM, EDTA 1mM) con GelRed (2  $\mu$ l/50ml). Las condiciones de la electroforesis fueron 80 voltios por 90 min. Para visualizar el producto de PCR, luego de la electroforesis los geles se colocaron en un transiluminador Kodak EDAS 290.

### Evaluación de la sensibilidad in vitro a 3 fungicidas

Para cada fungicida, Mertec 50 SC (ia. tiabendazol), Magnate 75 SG (ia. imazalil) y Rally 40 WP (ia. miclobutanil), se preparó una solución madre a 2000  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>, a partir de la cual se obtuvo las concentraciones a evaluar. El medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA. Difco, Le Pont de Claix, Francia) fue enmendado con una alícuota de la solución madre de manera que se obtuviera las siguientes concentraciones: 0,0; 0,1; 1,0; 10,0; 100,0  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>.

De cada aislamiento (25 en total) se tomaron discos de 8 mm de diámetro del borde de una colonia de 7 días de establecida en medio PDA, como se describió anteriormente. Los discos se colocaron en el centro de las placas Petri en forma invertida, de manera que el micelio quedara en contacto directo con el medio PDA enmendado con cada uno de los fungicidas. Para cada aislamiento y concentración de fungicida se prepararon 4 placas Petri. Las placas Petri se incubaron a una temperatura entre 22°C y 24°C durante 8 días, posteriormente se midió el diámetro de la colonia del hongo en forma horizontal y vertical (diámetro más largo y más corto), y se calculó el promedio para cada aislamiento en cada tratamiento.

### Análisis de los datos

Evaluación in vitro de la sensibilidad del crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum* sp., a 3 fungicidas poscosecha.

La sensibilidad de cada aislamiento a los fungicidas se evaluó con base en la  $CE_{50}$  (Concentración Efectiva Media), la concentración del fungicida que reduce el diámetro de la colonia en un 50% en el medio de cultivo enmendado con

fungicida en relación con el crecimiento en el medio de cultivo sin fungicida. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue determinado mediante la fórmula propuesta por Cole et al. (2005):

$$\% \text{inhibición} = \frac{(\text{diámetro promedio en PDA sin fungicida} - \text{diámetro promedio en PDA con fungicida})}{\text{diámetro promedio en PDA sin fungicida}} \times 100$$

Para obtener los valores de  $CE_{50}$  correspondiente a la concentración de cada fungicida, los valores promedio de inhibición de crecimiento micelial se graficaron contra el logaritmo de las concentraciones del fungicida y se determinó la regresión lineal. El logaritmo de la  $CE_{50}$  se calculó basando en la intersección con el eje "x" que corresponde al valor del 50% de inhibición en la regresión lineal. Los valores de la  $CE_{50}$  se calcularon como el antilogaritmo del resultado obtenido del logaritmo. Es decir, se reemplazó el valor "50" en las ecuaciones resultantes que relacionan la variable respuesta, el porcentaje de inhibición (y), con el logaritmo de la concentración del fungicida y se calculó el antilogaritmo.

Se empleó un diseño irrestricto al azar con un arreglo factorial 5x3x5 correspondiente a 5 zonas muestreadas, 3 fungicidas (Mertec 50 SC, Magnate 75 SG, Rally 40 WP) y 5 concentraciones de cada uno de los fungicidas (0,0; 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 ppm), con 4 repeticiones. Cada unidad experimental consistió de una caja Petri. Se comparó el valor medio de la  $CE_{50}$  entre fungicidas para los 25 aislamientos y entre zonas muestreadas para cada fungicida con el programa Infostat Software Estadístico Versión 2008.

## RESULTADOS

### Caracterización molecular

La amplificación del ADN, mediante PCR, con los imprimadores especie-específicos para *C.*

*gloeosporioides* (CgInt) en combinación con el imprimador universal ITS4, produjo un producto de PCR de aproximadamente 450 pb para los 25 aislamientos recolectados en las 5 zonas productoras de banano de altura del cantón de Turrialba; así como para el aislamiento control de *C. gloeosporioides* (+Cg), proveniente de frutos de papaya. Un ejemplo de los productos de PCR obtenidos se muestra en la Figura 2. No se obtuvo producto de amplificación con el aislamiento control de *C. acutatum* (+Ca). Un producto de PCR de aproximadamente 500 pb se obtuvo para el aislamiento control *C. acutatum* (+Ca), cuando se empleó el par de imprimadores CaInt2 (específico para *C. acutatum*) e ITS4; mientras que no hubo producto de amplificación para los aislamientos provenientes de banano de altura (Figura.3), ni para el control de *C. gloeosporioides*. En ambos casos, el tamaño de los productos de PCR corresponden al esperado con los imprimadores especie-específicos, 450 pb *C. gloeosporioides* y 500 pb *C. acutatum*, respectivamente (Sreenivasaprasad et al. 1996).

La amplificación del ADN de los 25 aislamientos provenientes de banano de altura con los imprimadores especie-específicos TBCG (*C. gloeosporioides*) y TBCA (*C. acutatum*), en combinación con el imprimador TB5, correspondientes a una región del gen de la  $\beta$ -tubulina, coincidió con los resultados anteriores. Un producto de PCR de aproximadamente 350 pb se observó para todos los aislamientos provenientes de banano y para el aislamiento control de *C. gloeosporioides* (+Cg), cuando se empleó el par

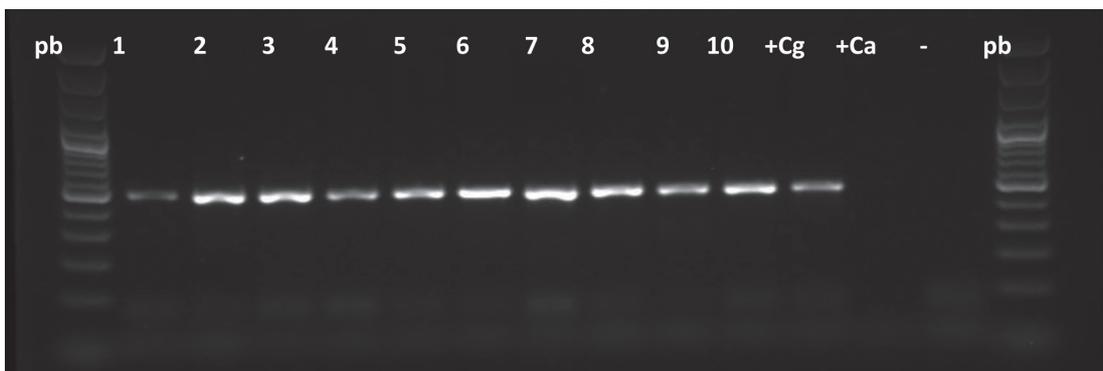


Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa de productos PCR obtenidos del ADN ribosomal de los aislamientos de *Colletotrichum* proveniente de frutos de bananos infectados (1 a 10) y controles (+Cg corresponde a *C. gloeosporioides*, +Ca corresponde a *C. acutatum*, -control negativo sin ADN), con los imprimadores CgInt + ITS4.

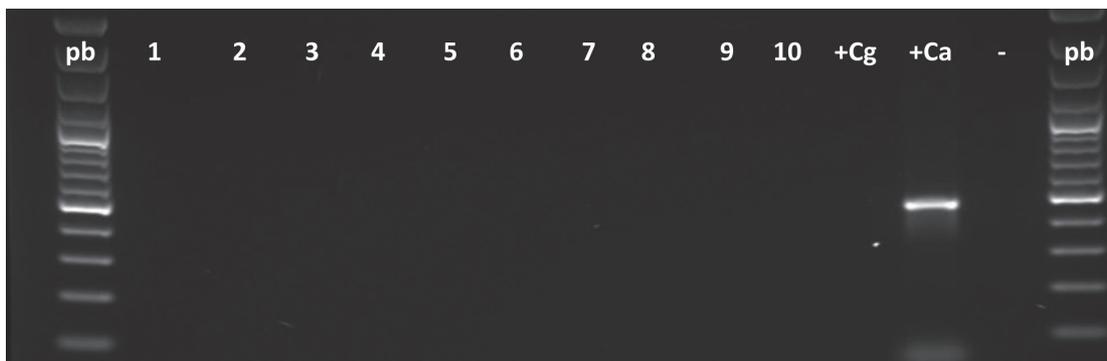


Fig. 3. Electroforesis en gel de agarosa de productos PCR obtenidos del ADN ribosomal de los aislamientos de *Colletotrichum* proveniente de frutos de bananos infectados (1 a 10) y controles (+Cg corresponde a *C. gloeosporioides*, +Ca corresponde a *C. acutatum*, -control negativo sin ADN), con los imprimadores CaInt2 + ITS4.

de imprimadores TBCG y TB5; en tanto que no se obtuvo amplificación para el aislamiento control de *C. acutatum* (+Ca). La Figura 4 muestra un ejemplo de los productos de PCR obtenidos con los imprimadores TBCG y TB5. Para el aislamiento control de *C. acutatum* (+Ca), un producto de PCR de aproximadamente 350 pb se produjo con la combinación de imprimadores

TBCA y TB5, en tanto que para ninguno de los aislamientos de banano de altura o el control de *C. gloeosporioides* (+Cg) se observó producto de PCR (Figura 5). En ambos casos, el tamaño de los productos de PCR corresponden al esperado con estos imprimadores especie-específicos, 350 pb *C. gloeosporioides* y 350 pb *C. acutatum* (Valero et al. 2010).

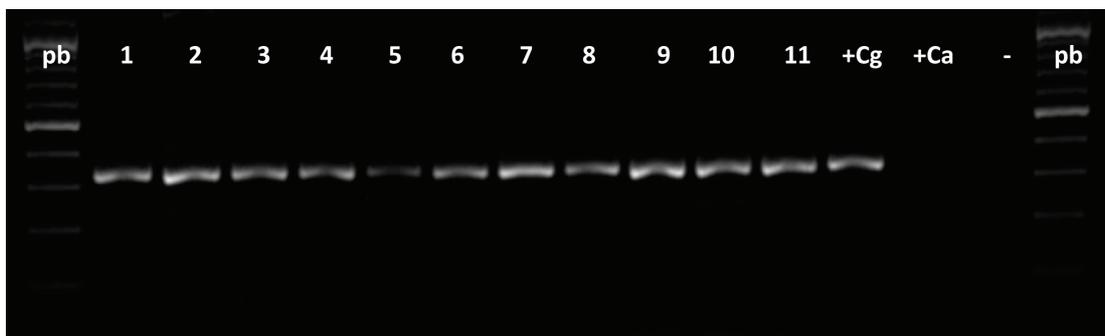


Fig. 4. Electroforesis en gel de agarosa de productos PCR obtenidos del ADN de los aislamientos de *Colletotrichum* proveniente de frutos de bananos infectados (1 a 5) y controles (+Ca corresponde a *C. acutatum*, +Cg corresponde a *C. gloeosporioides*, -control negativo sin ADN), con los imprimadores generados apartir de  $\beta$ -tubulina TB5+TBCG para *C. gloeosporioides*.

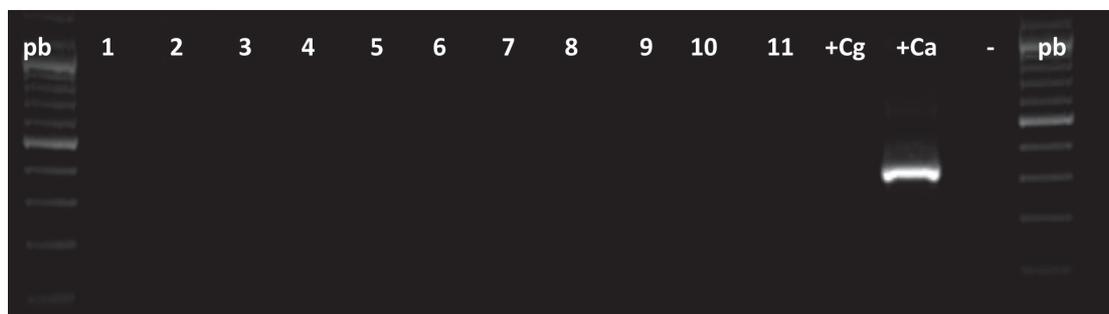


Fig. 5. Electroforesis en gel de agarosa de productos PCR obtenidos del ADN de los aislamientos de *Colletotrichum* proveniente de frutos de bananos infectados (1 a 5) y controles (+Ca corresponde a *C. acutatum*, +Cg corresponde a *C. gloeosporioides*, -control negativo sin ADN), con los imprimadores generados apartir de  $\beta$ -tubulina TB5 + TBCA para *C. acutatum*.

### Sensibilidad del crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum* sp., a los fungicidas tiabendazol, imazalil y miclobutanil

La  $CE_{50}$  promedio para los 25 aislamientos varió significativamente ( $p \leq 0,01$ ) entre los 3 fungicidas evaluados (Cuadro 2). El fungicida tiabendazol presentó la  $CE_{50}$  promedio más baja  $0,072 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , un rango de  $0,008$  a  $0,129 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , seguido por el imazalil ( $1,70 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dentro de un rango de  $0,06$  a  $5,10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) y el miclobutanil ( $3,98 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , en un rango de  $1,07$  a  $6,30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). El mayor rango

en sensibilidad lo presentó el tiabendazol con 16,12 veces de diferencia entre la  $CE_{50}$  más alta y la más baja (FR). Imazalil y miclobutanil presentaron un FR similar 4,69 y 5,88 veces, respectivamente.

La frecuencia de aislamientos según su  $CE_{50}$  se presenta en la Figura 6. Para los fungicidas tiabendazol e imazalil, los valores de  $CE_{50}$  presentaron una distribución unimodal; mientras que para el miclobutanil se observó una distribución bimodal. Para el tiabendazol, todos los aislamientos presentaron valores promedio de  $CE_{50}$  menores a  $0,55 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,

Cuadro 2. Concentración efectiva media promedio ( $CE_{50}$ ) del tiabendazol, imazalil y miclobutanil, determinada a partir de la sensibilidad del crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum gloesporioides*, proveniente de 5 zonas productoras de banano de altura en el cantón de Turrialba, Cartago.

Fungicida	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Desviación	Rango ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	FR
Tiabendazol	0,072 A	$\pm 0,049$	0,008-0,129	16,12
Imazalil	1,708 B	$\pm 0,626$	0,575-2,70	4,69
Miclobutanil	3,987 C	$\pm 1,684$	1,072-6,30	5,88

FR: Mayor  $CE_{50}$ / Menor  $CE_{50}$ . Prueba estadística utilizada: LSD Fisher ( $p \leq 0,01$ ).

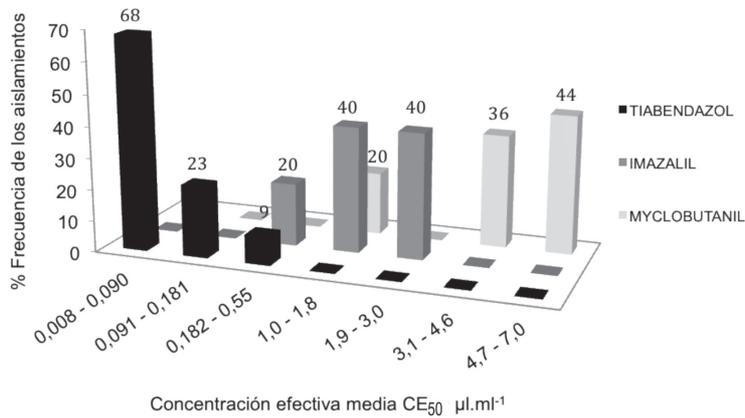


Fig. 6. Distribución de la frecuencia de la sensibilidad al tiabendazol, imazalil y miclobutanil en 25 aislamientos de *Collectotrichum* sp., proveniente de 5 zonas del cantón de Turrialba, Cartago.

mientras que para el imazalil el 80% de los aislamientos mostró valores entre 1,0 y 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  y para el miclobutanil el 80% entre 3,0 y 7,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

En relación con las 5 zonas muestreadas, se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) para la  $CE_{50}$  promedio entre zonas para cada fungicida y entre fungicidas para cada zona (Cuadro

3). Piedras Redondas presentó los valores más bajos de  $CE_{50}$  para los fungicidas tiabendazol e imazalil (0,04 y 1,13  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  respectivamente); mientras que para las otras zonas, el valor de la  $CE_{50}$  dependió del fungicida. Algunas zonas, San Juan Sur por ejemplo, presentó el valor más alto de  $CE_{50}$  para un fungicida (imazalil; 2,28  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) y el más bajo para otro (miclobutanil; 1,10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Cuadro 3. Valores promedio de la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) de 3 fungicidas determinada a partir de la sensibilidad del crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, proveniente de 5 zonas productoras de banano de altura en el cantón de Turrialba, Cartago.

Localidad	Fungicidas											
	Tiabendazol				Imazalil				Miclobutanil			
	$CE_{50}$ ( $mg.l^{-1}$ )	Desv (+/-)	Rango		$CE_{50}$ ( $mg.l^{-1}$ )	Desv (+/-)	Rango		$CE_{50}$ ( $mg.l^{-1}$ )	Desv (+/-)	Rango	
Piedras Redondas	0,04	A a	0,04	0,008-0,105	1,13	A a	0,88	0,575-2,692	4,68	BC b	0,15	4,46-4,78
Celulosa	0,05	AB a	0,01	0,068-0,095	1,89	AB a	0,56	1,259-2,692	5,17	C b	0,54	4,57-6,02
San Juan Sur	0,05	AB a	0,01	0,028-0,105	2,28	AB b	0,12	2,089-2,399	1,10	A c	0,05	1,04-1,17
Grano Oro	0,05	AB a	0,03	0,048-0,117	1,44	AB a	0,33	0,891-1,778	5,3	C b	1,26	3,16-6,31
Aiirro (FEJMA)	0,12	B a	0,06	0,069-0,219	1,80	B b	0,38	1,349-2,344	3,68	B c	0,18	3,54-3,98

Letras mayúsculas diferencias entre  $CE_{50}$  para cada una de las zonas, letras minúsculas diferencias para cada uno de los fungicidas por zona. Prueba estadística utilizada: LSD Fisher ( $p \leq 0,01$ ).

## DISCUSIÓN

Al igual que los bananos producidos comercialmente en las zonas costeras, el banano producido en el cantón de Turrialba (banano de altura) y cultivados bajo un sistema de no aplicación de fungicidas también es afectado por la antracnosis, lo que podría limitar su comercialización como producto fresco de exportación. En Filipinas, pequeños productores cultivan banano cerca de sus casas sin la aplicación de fungicidas en pre o poscosecha, los cuales son exportados a Japón, donde los consumidores prefieren este tipo de producto, sin embargo, la calidad de los frutos al llegar al mercado final es muy pobre debido a las enfermedades poscosecha, entre ellas la antracnosis, con una incidencia del 83% (Alvindhia y Natsuaki 2008).

### Identificación molecular

La amplificación del ADN, mediante PCR con imprimadores específicos para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, tanto de la región ITS como para una porción del gen de la  $\beta$ -tubulina, indicó que los 25 aislamientos de *Colletotrichum* spp., obtenidos de banano de altura en el cantón de Turrialba, corresponden a la especie *C. gloeosporioides*. Para ambas regiones se obtuvo un producto de PCR con los imprimadores específicos para *C. gloeosporioides* para los aislamientos provenientes de banano y el aislamiento control de (*C. gloeosporioides*) proveniente de papaya; pero no cuando se utilizó imprimadores específicos para *C. acutatum*. Con estos últimos se obtuvo amplificación únicamente para el aislamiento control de *C. acutatum*. El tamaño de producto de PCR fue de 450 pb para CgInt /ITS4 y 350 pb para TBCG /TB5, correspondiente al tamaño esperado para la amplificación con estos imprimadores de ADN perteneciente a *C. gloeosporioides* (Sreenivasaprasad et al. 1996, Valero et al. 2010). Ambos pares de imprimadores se han utilizado ampliamente para la confirmación de *C. gloeosporioides* como el agente causal de la antracnosis en diferentes hospedantes, incluidos frutos tropicales como, mango, marañón y papaya

(Sreenivasaprasad y Talhinhos 2005, Medeiros et al. 2010).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Hernández (2009), para aislamientos costarricenses provenientes de fincas de banano para exportación, ubicadas en las zonas Huetar Norte y Huetar Atlántica; y con los de Peres et al. (2002) en Brasil y Chung et al. (2010) en Taiwán; quienes determinaron que *C. gloeosporioides* es el agente causal de la antracnosis en banano.

*Colletotrichum musae* ha sido considerada la especie causante de la antracnosis en banano, con base en su especificidad por el hospedante (Peres et al. 2002, Lima et al. 2003, Hernández 2009, Jeger et al. 1995). Sin embargo, análisis filogenéticos recientes indican que *C. musae* y *C. gloeosporioides* son co-específicas, es decir no se diferencian como especie una de la otra (Moriwaki et al. 2002 y Du et al. 2005). En adición, Freeman y Katan (1997) señalan que la diferenciación de especies dentro del género *Colletotrichum* con base en el hospedante no es un criterio confiable. Por otra parte, *C. gloeosporioides* ha sido definida como una especie compuesta por aislamientos que difieren fisiológicamente, con algunos más virulentos hacia ciertos hospedantes que otros (Suzuki et al. 2010). Recientemente, Medeiros et al. (2010) demostraron la variabilidad intraespecífica presente en *C. gloeosporioides*, con la técnica ISSR (Secuencia entre Repeticiones Simples), que consiste en la amplificación mediante PCR del fragmento ubicado entre los microsatélites. Aislamientos de *C. gloeosporioides* provenientes de diferentes hospedantes, cebolla, mango, marañón, se agruparon de acuerdo al hospedante, lo que indica diferencia entre los aislamientos y especificidad por hospedante, dentro de la misma especie.

La evidencia recolectada a la fecha indica que *C. musae* es un linaje dentro de *C. gloeosporioides*, con especificidad hacia frutos de banano (Hernandez 2009). Por antigüedad en descripción y nomenclatura, *C. gloeosporioides* debe considerarse como la especie causante de la antracnosis en banano. Sin embargo, desde un punto de

vista práctico, aún se mantiene a *C. musae* como el agente causal de la antracnosis del banano (Niroshini y Karunaratne 2009, De Lapeyre de Bellaire et al. 2010); posiblemente hasta determinar si otras regiones del genoma permiten separar ambas especies y validar la taxonomía molecular dentro del género *Colletotrichum* (Hyde et al. 2009, Shivas y Tan 2009, Phoulivong et al. 2010).

Por otra parte, se ha demostrado que *Colletotrichum gloeosporioides* es una especie compleja que contiene varias especies genética y biológicamente separadas (por ejemplo, *Colletotrichum asianum*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum fruticola*, *Colletotrichum gloeosporioides* sensu stricto, B. Weir y P.R. Johnst., *Colletotrichum kahawae* J.M. Waller y Bridge, and *Colletotrichum siamense*) y se ha denominado complejo 'gloeosporioides' (Phoulivong et al. 2010). *C. gloeosporioides* sensu stricto incluiría a los aislamientos reconocidos como *C. gloeosporioides*. De manera que cabe la posibilidad que los 2 pares de imprimadores utilizados en el presente estudio no sean específicos para *C. gloeosporioides* sensu stricto sino que identifican a miembros del complejo 'gloeosporioides'. Análisis filogenéticos basados en diferentes loci permitirán dilucidar esta situación.

### Sensibilidad a fungicidas

Todos los aislamientos evaluados fueron sensibles al tiabendazol. Ningún aislamiento presentó una  $CE_{50}$  igual o superior a  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , a partir de la cual los aislamientos se consideran insensibles al fungicida (De Lapeyre de Bellaire y Dubois 1997). Este resultado contrasta con lo observado para aislamientos provenientes de zonas bananeras de producción intensiva para exportación tanto en Costa Rica (Hernández 2009) como en otros países (De Lapeyre de Bellaire y Dubois 1997), donde se ha encontrado aislamientos insensibles al tiabendazol. Para Costa Rica, Hernández (2009) determinó que el porcentaje de aislamientos insensibles al tiabendazol varió de un 25 a un 66%, según la finca.

La pérdida de sensibilidad al tiabendazol ha sido asociada al uso de fungicidas del mismo

grupo, benzimidazoles, para el combate de enfermedades en campo (pre-cosecha), particularmente benlate para el combate de la Sigatoka Amarilla (*Mycosphaerella musae*) (De Lapeyre de Bellaire y Dubois 1997). Los aislamientos analizados provienen de una zona sin historial de aplicación de fungicidas en banano, a excepción de Atirro (FEIMA), lo que explicaría la ausencia de aislamientos con pérdida de sensibilidad al tiabendazol.

Aislamientos provenientes de áreas regularmente expuestas a los fungicidas muestran por lo general una  $CE_{50}$  mayor que la de aislamientos de zonas sin uso frecuente de fungicidas, debido a la presión de selección que ejerce el agroquímico (Wong et al. 2007). En algunos casos, la población puede volverse insensible al fungicida, lo que se refleja en el campo como falta de combate del patógeno (resistencia de campo), perdiéndose una estrategia de manejo de la enfermedad. Los aislamientos asociados a banano de altura en el cantón de Turrialba presentaron una  $CE_{50}$  promedio para el tiabendazol de  $0,07 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  con un rango de  $0,008-0,129 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Hernández (2009) determinó para aislamientos provenientes de un 50% de las fincas bananeras que analizó, una  $CE_{50}$  promedio superior a  $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Una de las fincas ubicadas en el Valle la Estrella (Finca Río La Estrella) tuvo una  $CE_{50}$  de  $55 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$ .

Una proporción importante de aislamientos mostró una reducida sensibilidad al imazalil (80%) y al miclobutanil (100%). Este resultado concuerda con lo observado por Hernández (2009) para aislamientos de *Colletotrichum* sp., recolectados de banano proveniente de zonas silvestres (sin aplicación de fungicidas) y plantaciones comerciales (con aplicación de fungicidas). Ambos fungicidas pertenecen al grupo de inhibidores de la desmetilación del esteroil o en inglés "sterol demethylation inhibitors" (DMIs por sus siglas en inglés). Una correlación positiva entre la sensibilidad o pérdida de sensibilidad a fungicidas dentro de este grupo ha sido observada para diferentes patógenos, incluidos aislamientos del género *Colletotrichum* (Wong et al. 2007, Sombardier et al. 2010).

La baja eficacia del imazalil sobre aislamientos de *Colletotrichum* de banano no es sorprendente; a pesar de su uso actual en el combate de enfermedades poscosecha del banano, antracnosis y pudrición de corona (Aked et al. 2001, Villalta et al. 2006, Demerutis et al. 2008). En 1997, De Lapeyre de Bellaire y Dubois, en Guadalupe, indicaron que el imazalil, a pesar de ser otro de los fungicidas aprobados para el combate de enfermedades poscosecha, no podía ser considerado como un reemplazo del tiabendazol por su baja eficacia en el control de *C. musae*. Los resultados del presente trabajo y los de Hernández (2009) apoyan esta afirmación para las poblaciones costarricenses del agente causal de la antracnosis del banano.

El uso actual del imazalil, a pesar de la presencia de un alto porcentaje de aislamientos con sensibilidad reducida, puede estar asociado al hecho de que las dosis aplicadas para el combate de la enfermedad, entre 250 y 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Villalta et al. 2006), son lo suficientemente altas para proveer un adecuado combate tanto de los aislamientos sensibles como de aquellos con reducida sensibilidad. Una estrategia de combate con base en el uso de dosis de fungicidas del grupo DMI's relativamente altas ha sido propuesta por Koller y Scheinpflug (1987). Sin embargo, dosis muy altas pueden ser imprácticas y de costo elevado. Por otra parte, la alta proporción de aislamientos con sensibilidad reducida al imazalil indica que fallas en el combate de la enfermedad son previsibles en corto tiempo y que se está ante una situación crítica, cuya siguiente etapa es la resistencia práctica o de campo, si no se toman medidas anti-resistencia. Pérez et al. (2001) determinaron una  $\text{CE}_{50}$  promedio de 0,89  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para aislamientos de *C. musae*. Esta población fue sensible al imazalil (línea base). Los aislamientos provenientes de banano de altura presentaron una  $\text{CE}_{50}$  promedio de 1,71  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , aproximadamente el doble; con un 20% de aislamientos con una  $\text{CE}_{50}$  promedio 3 veces mayor.

Para el miclobutanil, tanto la  $\text{CE}_{50}$  promedio (3,987  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) como el factor de rango (FR: 5,88) de los aislamientos de *Colletotrichum*

asociados a banano de altura fueron casi idénticos a la  $\text{CE}_{50}$  promedio (3,8  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y al FR (5,4) determinados por Wong et al. (2007) para aislamientos de *C. cereale* provenientes de zonas expuestas a fungicidas y con pérdida de sensibilidad. Aislamientos recolectados de áreas sin historial de uso del fungicida (línea base) presentaron una  $\text{CE}_{50}$  promedio de 0,72  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en un rango de 0,19 a 1,30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . El FR para esta población fue de 7,2. En el presente trabajo solo los aislamientos de San Juan Sur mostraron una  $\text{CE}_{50}$  promedio y un rango similar, aunque ligeramente más alto, 1,10 (1,04–1,17)  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . El miclobutanil fue uno de los fungicidas DMI's con menor actividad contra *C. cereale*, por lo que no se recomienda su uso en el combate de este patógeno (Wong et al. 2007).

Si se considera que no existe un registro o historial de uso de fungicidas en banano en el cantón de Turrialba, la baja sensibilidad de los aislamientos al imazalil y al miclobutanil podría estar asociada al uso de fungicidas del grupo DMI's en otros cultivos en la zona, a la inmigración de aislamientos con reducida sensibilidad desde otras áreas o a ambos.

La baja eficacia de los fungicidas imazalil y miclobutanil sobre la especie de *Colletotrichum* asociada a banano llama a una revisión de su uso en el control de la antracnosis. Recientemente, fungicidas del grupo de las estrobirulinas han sido aprobados para su aplicación en banano en poscosecha con resultados promisorios (Schilder et al. 2001, Villalta et al. 2006).

Es recomendable establecer la línea base de sensibilidad a los fungicidas antes de su empleo a gran escala. Esta información puede ser utilizada posteriormente para evaluar cambios en sensibilidad de la población del patógeno blanco en los años siguientes. En el presente estudio, todos los aislamientos de *C. gloeosporioides* (*C. musae*) provenientes de banano de altura, en el cantón de Turrialba, fueron sensibles al fungicida tiabendazol. No obstante, la población mostró un amplio rango de variación de  $\text{CE}_{50}$  (FR: 16,12), lo que indica la posible existencia de aislamientos con sensibilidad reducida al fungicida. De

implementarse el uso de este fungicida en la zona, para el combate poscosecha de la antracnosis en banano, deben emplearse estrategias para limitar la selección de cepas insensibles. En adición, los datos presentados pueden ser utilizados para monitorear los cambios en sensibilidad de la población de esta zona en los próximos años. Además como población referencia (no expuesta al fungicida) en estudios de comparación de sensibilidad con poblaciones en contacto frecuente con el fungicida o fungicidas del mismo grupo. Por ejemplo, poblaciones del patógeno provenientes de plantaciones comerciales para exportación, como las ubicadas en la zona Atlántica de Costa Rica.

A la fecha, el método de combate más eficaz contra la antracnosis del banano es el químico, basado en la aplicación de fungicidas, principalmente tiabendazol. Sin embargo, el combate químico enfrenta una serie de problemas y limitaciones como la selección de cepas insensibles al fungicida en diferentes partes del mundo (incluida Costa Rica), la eficiencia del fungicida (que varía en función de la época y la zona de producción); preocupaciones en relación con la contaminación del medio ambiente; y finalmente, los consumidores son muy selectivos y prefieren productos que no hayan sido expuestos a agroquímicos, particularmente en poscosecha (Lassois et al. 2010).

Este panorama plantea la necesidad de establecer nuevas estrategias no químicas de combate como: medidas preventivas en el campo y en las empacadoras, técnicas de almacenamiento, métodos físicos y biológicos de combate (Carré et al. 2006, Niroshini y Karunaratne 2009, Lassois et al. 2010, Maqbool et al. 2010); algunas de las cuales ya se implementan o evalúan en plantaciones de banano para exportación en Costa Rica (Demerutis et al. 2008). Para la producción de banano de altura en el cantón de Turrialba, urge investigar la implementación de estas medidas de combate, si se desea obtener un producto de calidad tanto para exportación como para mercado local.

## LITERATURA CITADA

- AKED S., KHAN H., MAGAN N. 2001. Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. *Plant Pathology*. 50:601–608.
- ALVINDIA D., NATSUAKI K. 2008. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection* (27):81200–1207.
- CAI L., HYDE K., TAYLOR P., WEIR B., WALLER J., ABANG M., ZHANG J., YANG Y., PHOULIVONG S., LIU Z., PRIHASTUTI H., SHIVAS G., MCKENZIE E., JOHNSTON P. 2009. A polyphasic approach for studying Fungal Diversity 39:183–204.
- CARRÉ V., STANGARLIN J., BECKER A., ZANELLA A., GONÇALVES JÚNIOR A., SCHWAN K., FRANZENER G., CRUZ M. 2006. Postharvest control of *Colletotrichum musae* in banana (*Musa* sp.) with camphor (*Artemisia camphorata*) and chitosan. *Journal Scientia Agraria Paranaensis*. Brasil. 5:57–66.
- COLE T., COLE C., CONWAY E. 2005. Effectiveness of selected fungicides applied with or without surfactant in controlling anthracnose on three cultivars of *Euonymus fortunei*, *Journal of Applied Horticulture*. (7):16–19.
- CHUNG H., CHUNG C., PENG., YANG R., HUANG W. 2010. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. *Special Issue on Biocatalysis and Agriculture Biotechnology*. 3:17–24.
- DE LAPEYRE DE BELLAIRE L., CHILLET M., LASSOIS L., HAISSAM M. 2010. Crown rot of bananas: Preharvest factors involved in postharvest disease development and integrated control methods. *Plant Disease*. 94:648–658.
- DE LAPEYRE DE BELLAIRE L., DUBOIS C. 1997. Distribution of thiabendazole-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadalupe banana plantations. *Plant Disease* 81:1378–1383.
- DEMERUTIS C., QUIRÓSL., MARTINUZA., ALVARADO E., WILLIAMS R., ELLIS M. 2008. Evaluation of an organic treatment for post-harvest control of crown rot of banana. *Ecological Engineering* 3 4:324–327.
- DU M., SCHRDL C., NUCKLES E., VAILLANCOURT L. 2005. Using mating-type gene sequence for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia* 97:641–658.

- FREEMAN S., KATAN T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87:516-521.
- GUERBER J., LIU B., CORRELL J., JOHNSTON P. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95:872-895.
- GUZMÁN M., VILLALTA R. 2008. Eficacia de mezclas de azoxistrobina con tiabendazole para el combate de enfermedades poscosecha del banano (*Musa* AAA). *CORBANA* 34(61):1-10.
- HERNÁNDEZ R. 2009. Sensibilidad a fungicidas poscosecha e identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en frutos de banano en Costa Rica. Tesis de maestría. San José. Costa Rica. 96 p.
- HYDE K., CAI L., CANNON F., CROUCH A., CROUS W., DAMM U., GOODWIN H., CHEN H., JOHNSTON R., JONES G., LIU Y., MCKENZIE C., MORIWAKI J., NOIREUNG P., PENNYCOOK R., PFENNING H., PRIHASTUTI H., SATO T., SHIVAS G., TAN P., TAYLOR J., WEIR S., YANG L., ZHANG, Z. 2009. *Colletotrichum*-names in current use. *Fungal Diversity* 39:147-182.
- HYDE K., CAI L., MCKENZIE E., YANG Y., ZHANG J., PRIHASTUTI H. 2009. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39:1-17.
- INFOSTAT. 2008. Software estadístico. Manual de usuario. Córdoba, Argentina.
- JEGER M., EDEN-GREEN S., JOHANSON A., WALLER J., BROWN A. 1995. Banana diseases. In: *Banana and Plantains*. Edited by Gowen. Chapman and Hall. London, UK.
- KOLLER W., SCHEINPFLUG H. 1987. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors. *Plant Disease*. 71:1066-1074.
- LASSOIS L., BASTIAANSE H., CHILLET M., JULLIEN A., JIJAKLI M., DE LAPEYRE DE BELLAIRE L. 2010. Hand position on the bunch and source-sink ratio influence the banana fruit susceptibility to crown rot disease. *Annals of Applied Biology*. 156:221-229.
- LIMA R., OLIVEIRA S., MENEZES M. 2003. Caracterização enzimática e patogenicidad cruzada de *Colletotrichum* spp., asociados a doenças de pós-colheita. *Fitopatologia Brasileira* 28:620-625.
- LIU B., WASILVA L., MORELOCK T., O'NEIL N., CORRELL J. 2007. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp., for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility, and host specificity. *Phytopathology* 97:1305-1314.
- MAQBOOL M., ALI A., RAMACHANDRAN S., SMITH D., ALDERSON P.G.I. 2010. Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating. *Crop Protection* doi:10.1016/j.cropro.2010.06.005.
- MEDEIROS I., MACIEL D., MEDIEROS V., HOULLOU KIDO L., OLIVEIRA N. 2010. *pefB* gene in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from several hosts. *Genetics and Molecular Research* 9:661-673.
- MORIWAKI J., TSUKIBOSHI T., SATO T. 2002. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. *Journal Genetic Plant Pathology* 68:307-320.
- NIROSHINI W., KARUNARATNE A. 2009. Interactions of *Colletotrichum musae* and *Lasiodiplodia theobromae* and their biocontrol by *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp., in expression of crown rot of 'Embul' banana. *Biocontrol (NLD)*. 54:587-596.
- PERES N., KURUMAE E., DIAS M., DE SOUZA N. 2002. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp., affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal. Phytopathology*. 150:128-134.
- PÉREZ L., SÁENZ M., MAURI F. 2001. Control de la pudrición de la corona de los bananos en Cuba. I. Eficacia de benzimidazoles, imidazoles y triazoles. *Fitosanidad* 5:31-38.
- PHOULIVONG S., CAI L., CHEN H., MCKENZIE E., ABDELSALAM K., CHUKEATIROTE E., HYDE K.D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44:33-43.
- RAMIREZ C. 2010. "Ubicación Geográfica y Evaluación de la Calidad de Fruta de Banano de Altura que se produce en el Cantón de Turrialba, Costa Rica". Tesis para licenciatura, Universidad de Costa Rica. Turrialba, Costa Rica. 69 p.
- RAUT S., RANADE S. 2004. Diseases of banana and their management. *Disease of Fruits and Vegetables*. 2:37-57.
- ROGERS S., BENDICH A. 1988. In: *Plant Molecular Biology Manual*. S. B. Gelvin y R. A. Schilperoort (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. A6/1-11. (Modificado por SÁNCHEZ-CHIANG, N. 2009, Laboratorio de Técnicas Moleculares para la Fitoprotección, Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Universidad de Costa Rica.
- SCHILDER A., GILLET J., SYSAK R. 2001. Evaluation of Fungicides for Control of Anthracnose Fruit rot of blueberries fungicide and infanticide test. sp.
- SHIVAS R., TAN Y. 2009. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae*

- comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp., nov. Fungal Diversity 39:111-122.
- SOMBARDIER A., DUFOUR M., BLANCARD D., CORIO-COSTET M. 2010. Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides: distribution and reduced cross-sensitivity. Pest Manag Sci 66:35-43.
- SREENIVASAPRASAD S., SHARADA K., BROWN A., MILLS P. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathology 45:650-655.
- SREENIVASAPRASAD S., TALHINHAS P. 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. Molecular Plant Pathology 6:361-378.
- SUSUKI T., TANAKA C., EBIHARA Y., ITU Y., VEMATSU S. 2010. Genetic polymorphism and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne). Journal of General Plant Pathology. 76:247-253.
- UREÑA A., MACKENZIE S., BOWEN B., LEGARD D. 2002. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp., causing crown and fruit rot of strawberry. Phytopathology, 92:1245-1252.
- VALERO M., GARCÍA S., GINER M., ARANZAZU A., RUIZ J. 2010. Benomyl sensitivity assays and species-specific PCR reactions highlight association of two *Colletotrichum gloeosporioides* types and *C. acutatum* with rumple disease on Primofiori lemons. European Journal of Plant Pathology. 3:399-405.
- VILLALTA R., SAMPLE M., SHIELDS D., GUZMÁN M. 2006. Evaluación de fungicidas y mezclas de fungicidas para el combate de enfermedades poscosecha del banano (*Musa* AAA). CORBANA 32(59):17-33.
- WONG F., MIDLAND S., DE LA CERDA K. 2007. Occurrence and distribution of QoI-resistant isolates of *Colletotrichum cereale* from annual bluegrass in California. Plant Disease. 91:1531-1546.