

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y BIOQUÍMICA DE AISLAMIENTOS DE
COLLETOTRICHUM SPP. ASOCIADOS AL CULTIVO DE CAFÉ (*Coffea arabica*) EN
GUATEMALA



CLAUDIA AZUCENA OLIVA PINZÓN

GUATEMALA, JULIO DE 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y BIOQUÍMICA DE AISLAMIENTOS DE
COLLETOTRICHUM SPP. ASOCIADOS AL CULTIVO DE CAFÉ (*Coffea arabica*) EN
GUATEMALA

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE
LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

CLAUDIA AZUCENA OLIVA PINZÓN

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO

GUATEMALA, JULIO DE 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Lic. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	MSc. Francisco Javier Vásquez Vásquez
VOCAL I	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
VOCAL II	Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria
VOCAL III	MSc. Danilo Ernesto Dardón Ávila
VOCAL IV	Br. Rigoberto Morales Ventura
VOCAL V	Br. Miguel Armando Salazar Donis
SECRETARIO	MSc. Edwin Enrique Cano Morales

Guatemala, julio de 2009

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables Miembros:

De conformidad con la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGÉNICA Y BIOQUÍMICA DE AISLAMIENTOS DE
COLLETOTRICHUM SPP. ASOCIADOS AL CULTIVO DE CAFÉ (*COFFEA ARABICA*) EN
GUATEMALA.

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

En espera de su aprobación, me es grato presentarle mi agradecimiento.

Atentamente,

CLAUDIA AZUCENA OLIVA PINZÓN

ACTO QUE DEDICO

A:

MI DIOS

Gracias por estar siempre cerca y confiar en mi, por retarme a soñar y por cumplir tu palabra en mi vida. La honra, gloria y honor de este triunfo te lo rindo a ti.

MIS PADRES

Juan José Oliva Rodas y Herminia Pinzón de Oliva. Son los mejores padres del mundo, ejemplo de esfuerzo, fe, valentía y amor. Gracias por cuidarme, amarme y guiarme en el camino de la verdad, los amo con todo mi corazón. Lo logramos!!! sin ustedes no hubiese sido posible este logro.

MIS HERMANOS

José, Sory y Karina, por estar siempre junto a mi, apoyarme en toda mi carrera, creyendo que lo lograría. Los amo y estoy muy agradecida con Dios por los tres hermanos preciosos que me dio.

MIS CUÑADOS

Allan y Chekas, por ser un ejemplo de lideres, por el cariño sincero, por sus palabras y oraciones.

MI SOBRINO

Allan Rodrigo Medina Oliva, por llenar mi vida de tanta alegría.

MI PRIMA

Shirley Salazar Pinzón, por tu amistad y amor. Eres mi tercera hermana.

LAS FAMILIAS

Oliva, Pinzón Girón, Medina Villeda, Sequeira, Ardón Flores, Hernández Dávila, por el apoyo y cariño brindado.

CRISTOPHER ARDON

Por tu apoyo incondicional, tu cariño sincero y por animarme a seguir adelante siempre. Te quiero mucho.

MIS AMIGOS

Por todos los buenos momentos compartidos, cada sonrisa la llevo grabada en mi corazón. Especialmente a: Gaby Ortiz, Eu, Alejandra Gómez, Azucena Orantes, Loren Estévez y Mynor Morales, por ser parte de este gran sueño alcanzado, por las palabras de aliento y por darme ese apoyo que muchas veces necesite. Los quiero mucho.

TESIS QUE DEDICO

A:

DIOS

Eres el primero en vida, nada ni nadie esta antes que tu.
TODO LO PUEDO EN CRISTO QUE ME FORTALECE.

MIS PADRES

Por el esfuerzo realizado para que pudiera obtener el título, y por los desvelos de mi madre siempre que la necesitaba.

MIS HERMANOS

Por las palabras que me daban fuerzas para seguir, por ayudarme económicamente cuando lo necesite. Ahora me toca a mi y lo haré con gusto.

GUATEMALA

Mi país amado, bendito por Dios. Tierra de hombres y mujeres que luchan por alcanzar una vida mejor.

**UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE
GUATEMALA**

Por abrirme las puertas para lograr este sueño, por formar personas de éxito, dispuestas a contribuir para un mejor país.

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Por enseñarme y lograr en mí una profesional con valores y amor a mi carrera.

**LOS CAFICULTORES DE
GUATEMALA**

Que este aporte sea de utilidad en el gremio cafetalero.

AGRADECIMIENTO

A:

MI DIOS

Por darme sabiduría e inteligencia para culminar la carrera que tanto soñé.

ANACAFE/ANALAB

Por ser el ente financiante y el soporte institucional dado para la realización de esta investigación.

ING. ALVARO HERNANDEZ

Por brindarme su confianza, consejos y experiencia en todo momento, cuando más lo necesitaba. Valoro mucho su amistad sincera.

DR. EDIN OROZCO

Por su apoyo, asesoramiento y paciencia en la realización de este trabajo. Gracias por ayudarme a cumplir esta meta.

DRA. MARIA A. ALFARO

Por los consejos dados para crecer no solo profesionalmente, sino también personalmente.

**DR. FRANCISCO ANZUETO e
ING. HUMBERTO JIMENEZ**

Gracias por el apoyo brindado en la realización del EPS y la investigación dentro de las instalaciones de Analab.

MIS AMIGOS DE ANALAB

Ing. Pablo, Astrid, Víctor, Luís Fernando, Julio, Roy, Lucky, Patty, Ana Silvia, Héctor Chávez y Samayoa y Don Milito Por la amistad sincera que me brindaron y su ayuda en todo momento.

MAYACERT S.A.

Por el apoyo en la culminación de mi carrera y por hacerme parte de este maravilloso equipo de trabajo.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
Resumen	iv
1. Introducción.....	1
2. Definición del problema.....	3
3. Marco teórico.....	4
3.1 Marco conceptual.....	4
3.1.1 Historia y origen del cultivo de café (<i>Coffea arabica</i>).....	4
3.1.2 Importancia económica.....	4
3.1.3 Clasificación taxonómica del café.....	5
3.1.4 Morfología del café.....	5
3.1.4.1 Variedades de café estudiadas.....	6
3.1.5 Enfermedades comunes del cultivo de café en el ámbito mundial.....	6
3.1.6 Historia, ocurrencia y distribución de <i>Colletotrichum</i> spp. en café.....	7
3.1.7 Taxonomía de <i>Colletotrichum</i> spp. asociada al cultivo de café.....	7
3.1.8 Enfermedades ocasionadas por <i>Colletotrichum</i> spp. en el cultivo de café y síntomas.....	9
3.1.9 Estudios de patogenicidad de <i>Colletotrichum</i> spp.	10
3.1.10 Estudios bioquímicos de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. en café.....	11
3.1.11 Estudios de morfología de <i>Colletotrichum</i> spp. asociados al café.....	12
3.2 Marco referencial.....	14
3.2.1 Localización de los sitios de colecta.....	14
3.2.2 Ubicación y descripción del área de trabajo.....	14
4. Objetivos.....	15
4.1 General.....	15
4.2 Específicos.....	15
5. Hipótesis.....	16
6. Metodología.....	17
6.1 Características morfológicas de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.	17
6.1.1 Obtención de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. de café.....	17
6.1.2 Obtención de cultivos monospóricos.....	17
6.1.3 Crecimiento micelial.....	18
6.1.4 Coloración de las colonias.....	18
6.1.5 Dimensión de conidias.....	19
6.1.6 Apariencia del micelio.....	19
6.1.7 Formación de sectores.....	19
6.1.8 Germinación de conidias.....	19
6.2 Patogenicidad de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.	20
6.2.1 Patogenicidad de <i>Colletotrichum</i> spp. en hipocótilos de café.....	20
6.2.2 Patogenicidad de <i>Colletotrichum</i> spp. en frutos verdes de café.....	20
6.3 Caracterización bioquímica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.	21
6.3.1 Prueba de tartarato de amonio y ácido cítrico.....	21
6.3.2 Análisis de pH del medio líquido de crecimiento de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.	22

7.	Resultados.....	23
7.1	Caracterización morfológica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. asociados al cultivo de café (<i>Coffea arabica</i>) provenientes de diferentes regiones productoras del país	23
7.1.1	Aislamientos estudiados	23
7.1.2	Coloración de colonias y formación de sectores.....	23
7.1.3	Aspecto del micelio	24
7.1.4	Crecimiento micelial <i>in vitro</i>	27
7.1.5	Dimensión de conidias	28
7.1.6	Porcentaje de germinación de conidias	30
7.2	Determinación de la patogenicidad de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. en frutos e hipocótilos de café	32
7.2.1	Evaluación en hipocótilos.....	32
7.2.2	Evaluación en frutos.....	33
7.3	Estudio de las características bioquímicas de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. asociados al café.	36
7.3.1	Comportamiento de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. asociados al café en cuanto a la capacidad de utilizar ácido cítrico y tartrato de amonio.....	36
7.3.2	pH de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. asociados al café.....	37
8.	Conclusiones	39
9.	Recomendaciones.....	40
10.	Bibliografía.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Esquema de una rama de café.....	5
Figura 2. Frutos afectados por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	10
Figura 3. Relación compatible hospedero (plántulas de café) - patógeno (<i>Colletotrichum</i> sp.).....	11
Figura 4. Caracterización morfológica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. I = aislado del hongo.....	13
Figura 5. Características morfológicas de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. se muestra color de colonia, formación de sectores y aspecto de micelio.....	26
Figura 6. Curvas de germinación de conidias de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. en el cultivo de café procedente de cinco zonas cafetaleras.....	31
Figura 7. Evaluación de patogenicidad de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> en frutos verdes de café.....	35
Figura 8. Resultados de caracterización de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. con uso de citrato y tartrato de amonio.....	37
Figura 9. Comparación de pH final de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. provenientes de áreas productoras de Guatemala, ANACAFE, 2007.....	38

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PÁGINA
Cuadro 1. Datos geográficos, climatológicos y zonas de vida de las localidades de colecta de aislamientos del hongo en áreas cafetaleras de Guatemala, 2007.	14
Cuadro 2. Datos de origen de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. utilizados en la caracterización morfológica, patogénica y bioquímica de dicho patógeno, ANACAFE, 2007.	24
Cuadro 3. Características morfológicas de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp., procedentes de zonas cafetaleras de Guatemala, ANACAFE 2007.	25
Cuadro 4. Análisis de varianza para IVCM de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.	27
Cuadro 5. Índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM) de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp., en medio malta-agar a 25°C, provenientes de plantaciones cafetaleras de Guatemala, ANACAFE, 2007.	28
Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable largo de conidias de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.	28
Cuadro 7. Análisis de varianza para ancho de conidias de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. ...	29
Cuadro 8. Dimensiones (ancho y largo) de conidias de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. provenientes de áreas cafetaleras de Guatemala, ANACAFE, 2007.	29
Cuadro 9. Evaluación patogénica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. en tres variedades de café. ANACAFE, 2007.	34

Caracterización morfológica, patogénica y bioquímica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados al cultivo de café (*Coffea arabica*) en Guatemala.

Resumen

En la producción del cultivo de café, enfermedades tienen incidencia en la calidad del grano y economía de los productores. *Colletotrichum* spp. es un hongo que afecta la planta de café. Causa secamiento de puntas de ramas, antracnosis en hojas y frutos. Se encuentra ampliamente distribuido en las regiones cafetaleras húmedas y cálidas de Guatemala. El estudio de la biología de dicho patógeno y aspectos de patogenicidad, sirve para brindar recomendaciones de manejo de la enfermedad.

Se estudiaron las características morfológicas, bioquímicas y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp., provenientes de regiones productoras de café y la determinación de la especie del hongo. Se obtuvo material vegetal enfermo de café de 9 zonas cafetaleras de Guatemala. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de protección vegetal, de ANACAFE en el año 2007.

Se observó variabilidad en cuanto a caracteres morfológicos de los 9 aislamientos estudiados, dicho comportamiento corresponde a la especie *Colletotrichum gloeosporioides*. En cuanto a la patogenicidad de los aislamientos del hongo, estudiada en hipocótilos de las variedades Caturra, Catuaí, Pache colís y Catimor, no se consideraron patogénicos basado en el criterio de Waller et al. (1993). Sin embargo, cuando se hizo inoculación de conidias en frutos verdes, fueron patogénicos. La variedad menos susceptible fue Pache colís y la más susceptible fue la variedad Catuaí. En la prueba de medición de pH del medio líquido utilizado en el crecimiento de los aislamientos, se observó cierta tendencia a la alcalinización del medio. El comportamiento de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. en cuanto a utilizar fuentes de carbono fue positivo, todos metabolizaron citrato y tartrato de amonio, considerada efectiva como paso inicial para determinar especie y complementada con los caracteres morfológicos. Según pruebas realizadas, los aislamientos caracterizados corresponden a la especie *C. gloeosporioides*. Se recomendó realizar inoculación de conidias del hongo en frutos verdes de café como prueba para determinar patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. y determinar resistencia de genotipos de café. La prueba bioquímica de ácido cítrico y tartrato de amonio es efectiva para determinar especie del hongo.

1. Introducción

Centro América es la tercera región cafetalera de importancia económica mundial, después de América del Sur por el volumen que produce. En Guatemala, el café se cultiva en zonas montañosas de la boca costa del Pacífico y en menor escala en la del Atlántico. Su producción oscila entre 4 a 5 millones de quintales oro, el mayor en el istmo centroamericano y quinto productor a nivel mundial.

La caficultura como negocio agrícola se ve afectada por factores bióticos o abióticos que inciden en la producción de café. Entre estos los principales problemas se tienen con la presencia de enfermedades fitopatológicas. Algunos problemas asociados en plantaciones de café observados son caída de frutos y hojas, necrosis en frutos y hojas y secamiento de ramas, los cuales coinciden con las épocas de alta humedad relativa y precipitación en las plantaciones de café. Esos síntomas se asocian a daños ocasionados por el complejo de patógenos del género *Colletotrichum* spp.

Colletotrichum es un hongo fitopatógeno importante en todo el mundo, debido a las pérdidas económicas que ocasiona en diversos cultivos agrícolas. Para el cultivo de café se reportan las especies *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. kahawae*. Dentro de estas especies, la que ocasiona mayores problemas patogénicos es *C. kahawae*, que de acuerdo a la literatura, aun no se reporta para Latinoamérica.

En la presente investigación se estudiaron las características morfológicas, patogénicas y bioquímicas de nueve aislamientos de *Colletotrichum* spp. provenientes de nueve regiones cafetaleras de Guatemala y se identificó la especie. Fueron obtenidos a partir de hojas, ramas y frutos del café con síntomas de antracnosis.

En la morfología de *Colletotrichum* spp. se estudió las características de índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM), coloración de colonias, dimensión de conidias y porcentaje de germinación. La coloración que presentó la colonia de los aislamientos fue color ceniza oscuro y claro. En cuanto al aspecto del micelio se obtuvo un 50% algodonoso y 50% superficial. El IVCM que predominó fue el relacionado con la categoría de crecimiento rápido *in vitro*. La dimensión de las conidias varió entre 4.23 y 5.01 μm de ancho y el largo entre 12.11 y 18.98 μm ; la germinación

de conidias fue 100% en agua destilada en concentración de 10^5 conidias/ μL a 25°C en un período de 8 a 10 horas.

Para determinar la patogenicidad de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. se hizo la inoculación de suspensión de conidias en frutos verdes e hipocótilos de diferentes variedades de café comerciales en Guatemala. Los aislamientos de *C. gloeosporioides* estudiados no fueron considerados patogénicos en hipocótilos de café de acuerdo al criterio de Waller et al. (1993), pero hubo colonización del hongo en las plántulas. Para frutos verdes los aislamientos de *Colletotrichum* se consideraron patogénicos. La variedad más susceptible al patógeno fue Catuaí, mientras que Pache colis y Caturra son más resistentes.

En la caracterización bioquímica de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. estudiados, se observó cierta tendencia de incremento de pH del medio MEA (alcalinización). En cuanto a la habilidad de utilizar ácido cítrico y tartrato de amonio, el resultado fue positivo, es decir, hubo metabolización por parte del hongo.

Según pruebas realizadas y caracteres morfológicos, los aislamientos caracterizados corresponden a la especie *C. gloeosporioides*. Se recomendó realizar inoculación de conidias del hongo en frutos verdes de café como prueba para determinar patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. y determinar resistencia de genotipos de café. La prueba bioquímica de ácido cítrico y tartrato de amonio es efectiva para determinar especie del hongo.

2. Definición del problema

Son varios los fitopatógenos que afectan el cultivo de café en Guatemala. Se menciona *Xylella fastidiosa*, *Fusarium* spp., *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Cercospora* spp. *Hemileia vastatrix*, *Mycena citricolor*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Rosellinia* spp. y *Colletotrichum gloeosporioides*, entre otros. La importancia de estos agentes infecciosos es relativa de acuerdo a la región del país, manejo agronómico del cultivo y genotipo utilizado por los agricultores. Los problemas que ocasionan, no se han estudiado de manera profunda.

Referido a *Colletotrichum* spp., es un hongo que afecta las plantaciones de café. Causa secamiento de puntas de ramas, antracnosis en hojas y frutos. Se encuentra ampliamente distribuido en las regiones cafetaleras húmedas y cálidas de Guatemala. Las pérdidas son variables. La presente investigación, se hizo debido a la importancia de dicho patógeno, los problemas que ocasiona en el cultivo de café y falta de información en el país. El estudio de la biología de dicho patógeno y aspectos de patogenicidad, sirve para brindar recomendaciones de manejo de la enfermedad y para determinación de especies del hongo.

3. Marco teórico

3.1 Marco conceptual

3.1.1 Historia y origen del cultivo de café (*Coffea arabica*)

El café es el segundo producto más comercializado en el mundo después del petróleo. Esto explica, en sí, su trascendencia, tanto para los países productores como para los países consumidores (Wagner, 2001).

Oriundo de Etiopía, el café se difundió como bebida en Arabia, entre los siglos XIII al XV; en el Cercano Oriente, en el siglo XVI; en Europa, en el XVII; y, en América, en el siglo XVIII. Como cultivo se aclimató rápidamente en el Nuevo Mundo. Varios países asiáticos, latinoamericanos y africanos, entre los Trópicos de Cáncer y de Capricornio, encontraron en este producto la clave para su desarrollo económico (Wagner, 2001).

La importancia del café radica en que, como cultivo y como artículo de exportación y consumo, pasa por una serie de procesos y etapas que involucran a millones de personas, actividades como: formación de almácigos, trasplante, cultivo, poda, cosecha, despulpado, fermentación, lavado, secado, descascarado, escogido, empaque, comercialización, transporte, embarque, desembarque, separación, mezcla, tueste, empaque y etiquetado, hasta su venta al detalle, son parte del proceso de generación de empleo (Wagner, 2001).

Para el caso de Guatemala, existen estudios que han investigado y analizado el café desde diferentes puntos de vista, y han determinado características particulares de las regiones productoras del país (Cuchet & Guerrero, 1995).

3.1.2 Importancia económica

Las exportaciones del país durante la temporada 2006/2007 aumentaron en un 12%, en comparación a la temporada 2005-2006. En total, se vendieron en el mercado internacional 4.8 millones de quintales oro.

El ingreso de divisas por concepto de exportaciones de café registró su nivel más alto en siete años. Durante la temporada 2006/2007 se captaron \$ 557 millones, \$ 94 millones adicionales ó 20 por ciento arriba de los ingresos percibidos la temporada anterior.

Durante el período 2006/2007, Anacafé continuó fortaleciendo la Caficultura, con el propósito de que cada uno de los productores guatemaltecos contara con las herramientas para producir más y mejor.

3.1.3 Clasificación taxonómica del café

La planta de café pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Dicotyledónea, sub-clase Asteridae, orden Rubiales, familia Rubiaceae, género *Coffea* y especie *C. arabica* (ANACAFE, 2006).

3.1.4 Morfología del café



La planta de café tiene un solo eje, en cuyo extremo hay una zona de crecimiento activo que alarga el tallo, formando nudos y entrenudos. Las ramas laterales se alargan y la parte superior del eje vertical continúa creciendo, así se producen nuevas ramas en diversos ángulos y la planta adquiere forma cónica.

El eje central o rama ortotrópica crece verticalmente, sólo produce yemas vegetativas. Las ramas laterales o plagiotrópicas, llamadas "bandolas" son las ramas primarias y dan origen a ramas secundarias o de segundo orden, de las que a su vez pueden salir ramillas terciarias. Las ramas secundarias y terciarias, constituyen lo que se conoce como palmilla de café (ANACAFE, 2006).

Figura 1. Esquema de una rama de café. Fuente: ANACAFE, 2006.

La cosecha se concentra en el crecimiento nuevo de ramas inferiores y ramas nuevas del ápice, las axilas florales sólo producen una vez. Por esta razón la producción anual se incrementa durante los primeros 3 ó 5 años, tendiendo luego a disminuir, lo que hace necesario la práctica de la poda o recepa (ICAFE, 1990).

3.1.4.1 Variedades de café estudiadas

Catuái: resultado del cruzamiento entre Mundo Novo y Caturra en Brasil. Es variedad de porte bajo, las ramas forman un ángulo de porte cerrado y entrenudos cortos. El fruto no se desprende fácilmente de la rama, lo cual es muy importante para las zonas donde la maduración coincide con la época de lluvia. Se adapta bien en altitudes que van de 800 - 1400 msnm en la Boca Costa, de 1100 - 1700 msnm en la zona central oriental y norte del país (ANACAFE, 2006).

Pache colis: es originaria de Mataquescuintla, Jalapa (Guatemala), y fue encontrada dentro de plantaciones de Caturra y Pache Comen. Posee frutos rojos y de tamaño grande, hojas elípticas onduladas de consistencia áspera. Presenta cierta tolerancia a *Phoma* sp. Planta de porte bajo con entrenudos cortos, con altura de 0.80 – 1.25 m. Se adapta muy bien en altitud de 900 - 1900 msnm con temperaturas frescas oscilantes entre 20-21°C (ANACAFE, 2006).

3.1.5 Enfermedades comunes del cultivo de café en el ámbito mundial

- “Coffee berry disease” = CBD (*Colletotrichum kahawae*)
- Antracnosis y mancha mantecosa (*Colletotrichum gloeosporioides*)
- Roya (*Hemileia vastatrix*)
- Cercospora (*Cercospora* spp.)
- Mancha de phoma (*Phoma* spp.)
- Mancha de ascochyta (*Ascochyta* spp.) (Orozco, 2003)

3.1.6 Historia, ocurrencia y distribución de *Colletotrichum* spp. en café

Varios nombres han sido dados a las enfermedades ocasionadas por *Colletotrichum* spp.: antracnosis del café, quema castaña “brown blight”, “die-back”, “elon die-back” y CBD (“coffee berry disease”). La CBD, ocasiona los mayores problemas en África. El primer relato de esta enfermedad fue descubierto por Mc Donald, en 1926 (11). El agente causal fue identificado por el mismo autor, en 1923, como *Colletotrichum coffeanum* Noack, causando considerables problemas, atacando frutos de café en diferentes etapas de crecimiento. Basados en estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares se sabe que en el continente americano no se conoce ningún relato de CBD (Orozco, 2003).

En América, *Colletotrichum* spp. esta asociado al cultivo de café provocando antracnosis en hojas, frutos, mancha mantecosa y secamiento de puntas, entre otros. Wellman (1957) menciona que la enfermedad “blister spot” es provocado por virus en Costa Rica, pero Vargas y Gonzáles (1972) (20), demostraron que es ocasionada por *Colletotrichum*. En América Central, hay una enfermedad denominada “coffee berry necrosis” provocada por *Colletotrichum* spp., fue relatada en 1963. La infección y la incidencia de *Colletotrichum* spp. varía dependiendo el órgano de la planta, (Rayner, 1952).

3.1.7 Taxonomía de *Colletotrichum* spp. asociada al cultivo de café

La taxonomía de *Colletotrichum* asociada al cultivo de café ha sido confusa. Desde sus primeros relatos en Brasil, fue clasificado por Noack como *Colletotrichum coffeanum*, en el año 1901. Esta designación fue utilizada por más de 70 años, para todos los aislamientos de *Colletotrichum* asociados al café (Noack, 1902).

Varias propuestas de clasificación para los aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados al café han sido presentados a lo largo de los años. Rayner [(1948) y (1952)] designó los aislamientos que ocasionan a CBD como *C. coffeanum* “var. *Virulans*”, teniendo por base las características morfológicas, como la coloración grisáceo verdoso del micelio de los aislamiento. Gibbs (1969), definió 4 formas de *Colletotrichum* por medio de las características de la colonia a partir de cultivos monospóricos en medio MAA: 1. CBD (= *C. coffeanum* var. *Virulans*, sensu Rayner 1948); 2. ccp (= *C. coffeanum*, “pink”; 3. ccm (= *C. coffeanum*, “mycelial form”) y 4. cca (=

C. coffeanum, “acervuli form”). También menciona que, de acuerdo con esas características, es posible distinguir la raza que ocasiona el CBD de otra no patogénica.

Hindorf (1970) realizó estudios morfológicos detallados en aislamientos de *Colletotrichum*. Algunos aislamientos son clasificados por Hindorf como *Colletotrichum coffeanum* Noack (sensu stricto) (= CBD “var. *Virulans*” de Rayner, = CBD de Gibs); *C. acutatum* Simmons (= ccp); *C. gloeosporioides* Penz. “white mycelium form” (=cca); *C. gloeosporioides* “greenish mycelium form” con su teleomorfo *Glomerella cingulata*. Hindorf describe las características morfológicas para separar *Colletotrichum coffeanum* (sensu stricto) = CBD en medio MAA y menciona que la forma teleomórfica de esta especie no fue observada. Así mismo, la designación de *C. coffeanum* para la forma patogénica de los frutos verdes fue mantenida por ese tiempo.

La clasificación actual utilizada por la mayoría de fitopatólogos contempla la propuesta de Waller et al. (1993). La propuesta esta basada en características patogénicas, metabólicas y de aislamientos frescos de *Colletotrichum*. Ellos proponen el cambio del nombre de *C. coffeanum* sensu Hindorf para *Colletotrichum kahawae* J. M. Waller y P. D. Bridge, la cual sería una especie nueva.

Las características consideradas para *C. kahawae*, por Waller et al. (1993) son resumidas de la siguiente forma: a partir de cultivos monospóricos del hongo, se observa el crecimiento micelial lento ($2-4 \text{ mm d}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) en medio malta agar agua MAA 2%, abundante micelio de coloración verdoso grisáceo a verdeado oscuro, sin producción de acérvulos y esporulación en hifas simples. En el metabolismo, aislamientos de esta especie no pueden utilizar citrato o tartrato como únicas fuentes de carbono. Esta especie es patogénica en frutos verdes en el estado de expansión y en hipocótilos de *Coffea arabica* y otros cultivares susceptibles, causando lesiones en depresión, típicas de antracnosis.

Para la especie *Colletotrichum gloeosporioides*, en las mismas condiciones, el crecimiento es rápido ($3-6 \text{ mm d}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), micelio blanco o grisáceo claro, esporulación en acérvulos o hifas simples. Puede utilizar tartrato, citrato o ambos como únicas fuentes de carbono. Los aislamientos de esta especie no son patogénicos en frutos verdes en expansión o hipocótilos, (Wellman, 1957). Contrario a esto Orozco (2003), menciona patogenicidad de algunos aislamientos de *C. gloeosporioides*.

Las propuestas han sido utilizadas, pero las características contempladas para caracterizar esta especie continúan presentando limitaciones para diferenciar los aislamientos de *Colletotrichum* spp.

3.1.8 Enfermedades ocasionadas por *Colletotrichum* spp. en el cultivo de café y síntomas

Las principales enfermedades que afectan la productividad del café en el mundo son de origen fúngica. En África, *C. kahawae* ocasiona la CBD, atacando frutos verdes en crecimiento, siendo este el principal factor limitante para la producción, (Waller; Bridge; Black; Hakazit, 1993).

En los países de América donde se cultiva café, *Colletotrichum* spp. ha sido asociado a síntomas de antracnosis en hojas, frutos, mancha mantecosa y secamiento de puntas (Orozco, 2003). La antracnosis en las hojas del cultivo de café se presenta como manchas irregulares, grandes, coloración castaña y castaña verdosa, ocurriendo comúnmente en los márgenes de las hojas. Estructuras del anamorfo y teleomorfo han sido observadas en hojas enfermas (Hindorf, 1970).

El ataque del hongo sobre las hojas nuevas y en las puntas de las rama puede causar “el on die-back”, caracterizado por la abscisión de las hojas. En seguida, la lesión se dirige al tejido vascular (Nutran & Roberts, 1964).

La enfermedad de la mancha mantecosa fue descrita por primera vez sobre *C. arabica* en Costa Rica por Wellman (1957), quien la atribuyó a virus, basándose en transmisiones por injerto y por el áfido *Toxoptera aurantii* Boyer, pero Vargas y González (1972) (21), demostraron que la misma es ocasionada por *Colletotrichum* spp. Los síntomas han sido descritos por Wellman (1957). Se producen manchas típicas circulares no necróticas, en las hojas, tanto en el haz como en el envés; las manchas son de color verde pálido a amarillo, miden de 2 a 6 mm de diámetro, son ligeramente hundidas y menos brillantes que la superficie normal de la hoja.

En los frutos, las lesiones iniciales son más pequeñas, no necróticas, hundidas y café-amarillentas. En frutos tiernos se produce necrosis total mientras que en frutos maduros o casi maduros aparecen áreas necróticas que pueden llegar a cubrir el fruto, produciendo su caída (Orozco, 2003).



Figura 2. Frutos afectados por *Colletotrichum gloeosporioides*

3.1.9 Estudios de patogenicidad de *Colletotrichum* spp.

Waller et al; (1993), caracterizaron la patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de acuerdo con el porcentaje de infección de hipocótilos de café. Según los autores, los aislamientos del hongo son considerados patogénicos cuando más del 25% de las plántulas inoculadas con el patógeno se mueren. En la práctica, los aislamientos patogénicos regularmente causan la muerte a más del 30% de las plántulas, en cuanto los aislamientos no patogénicos no presentan ningún efecto.

Pruebas realizadas con *C. gloeosporioides* para determinar la resistencia en hipocótilos de café, mencionan la existencia de relaciones compatibles e incompatibles en el patosistema *Colletotrichum* x café (Orozco, 2003).

Dorizzotto & Abreu (1993), estudiaron la patogenicidad de aislados de *Colletotrichum* spp. en plántulas y frutos verdes de café en progenies de cafetos originadas de un determinado híbrido, concluyendo que todos los genotipos fueron susceptibles al patógeno. Existen investigaciones

que sustentan el pensamiento de que *Colletotrichum* spp. es un hongo endofítico oportunista que se manifiesta en condiciones de estrés.

Orozco (2003), estudió también la patogenicidad de *Colletotrichum* spp., inoculando frutos verdes con el hongo, y concluyó que los porcentajes de frutos necrosados y el tiempo de apareamiento de los síntomas fueron variables de acuerdo con los aislamientos y el cultivar. Los frutos inoculados con *Colletotrichum* spp., que no necrosaron, mostraron maduramiento rápido después de haber sido inoculados con el hongo, mientras que los frutos utilizados como testigo e inoculados con agua esterilizada permanecieron verdes.



Figura 3. Relación compatible hospedero (plántulas de café) - patógeno (*Colletotrichum* sp.)
(Orozco, 2003)

3.1.10 Estudios bioquímicos de aislados de *Colletotrichum* spp. en café

La habilidad de los hongos filamentosos para utilizar determinados compuestos como únicas fuentes de carbono han sido utilizadas por los investigadores con diferentes objetivos. Paterson & Bridge (1994), mencionan que la asimilación de carbono se realiza preparando un medio base, el cual es incorporada a la fuente de carbono de interés. La asimilación es usualmente determinada cualitativamente por la observación visual de crecimiento en medio líquido o bien cuantitativamente por la determinación de peso seco del hongo.

En relación a las características bioquímicas de aislados de *Colletotrichum* spp., se menciona que *C. kahawae* no puede utilizar citrato o tartrato como únicas fuentes de carbono,

(Waller, Bridge, Black & Hakazit, 1993). Esto es observado cuando existe cambio de color del medio de amarillo a púrpura.

Várzea (1995) estudió el pH final del medio líquido de crecimiento de aislados de *Colletotrichum* spp., habiendo encontrado una mayor variabilidad de valores de pH entre los diferentes aislados estudiados.

3.1.11 Estudios de morfología de *Colletotrichum* spp. asociados al café

La caracterización morfológica de aislados de *Colletotrichum* spp. asociados al café es el campo más explorado debido a que es un método clásico. Los investigadores han orientado sus investigaciones con fines taxonómicos, para conocer la variabilidad y biología del patógeno (Gibbs, 1969 y Hindorf, 1970).

Las características morfológicas normalmente utilizadas para la determinación de especies de *Colletotrichum* son las características de la colonia, crecimiento micelial, dimensiones de conidias, forma de apresorios, presencia o ausencia de setas, entre otras (Gibbs, 1969).

Orozco (2003), estudió los aspectos físicos de colonias, el crecimiento micelial y dimensiones de conidias de 35 aislamientos de *Colletotrichum* spp. para determinar la variabilidad y realizar comparaciones con aislados de *C. kahawae*. Los aislamientos tuvieron variaciones en cuanto a las características morfológicas microscópicas, macroscópicas y reproductivas entre los aislados de *Colletotrichum* spp., estudiados en medio MAA. El crecimiento micelial de la mayoría de los aislamientos fue rápido. Dada esta característica, los aislados correspondieron a *C. gloeosporioides*.

Aislamientos de crecimiento intermedio, de coloración rosa y conidias fusiformes pertenecieron a *C. acutatum* (Orozco, 2003). Las dimensiones de las conidias variaron entre 4.0-16 µm de largo. En la mayoría de los aislamientos, sus conidias presentaron un ancho de 5.00 µm.

Hubo formación de apresorios para todos los aislamientos caracterizados, presencia de setas, acérvulos en su mayoría, así como formación de la fase teleomórfica (Orozco, 2003).

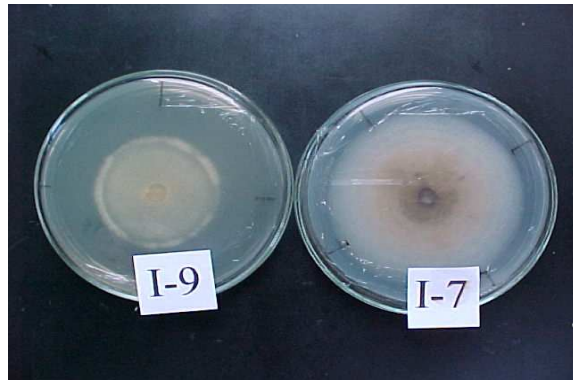


Figura 4. Caracterización morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. I = aislado del hongo (Orozco, 2003).

3.2 Marco referencial

3.2.1 Localización de los sitios de colecta

En el cuadro 1 se presenta el listado de las localidades, con sus respectivas características climatológicas y coordenadas geográficas, donde se recolectó el material para el estudio, así como también las zonas de vida según Holdrige (10).

Cuadro 1. Datos geográficos, climatológicos y zonas de vida de las localidades de colecta de aislamientos del hongo en áreas cafetaleras de Guatemala, 2007.

Región	Altitud (msnm)	Pp (mm /año)	T °C	HR %	Suelos	Lat	Long	Zona de Vida
I San Marcos	1300-1800	4000-5000	21-27	70-80	Volcánicos	14°57'40"	91°47'44"	<i>Bosque muy Húmedo Montano Bajo Subtropical</i>
II Atitlán, Sololá	1500-1700	1800-2300	20-23	75-85	Volcánicos	14°46'12"	91°10'58"	<i>Bosque Húmedo Montano Bajo Subtropical</i>
III Fraijanes y Antigua	1400-1800	1500-3000	12-26	70-90	Volcánicos	14°27'45"	90°26'25"	<i>Bosque Húmedo Subtropical (templado)</i>
IV Santa Rosa	1300-1700	1800-2000	18-25	70-80	Metamórficos y arcillosos	14°11'18"	90°16'39"	<i>Bosque Húmedo Subtropical (templado)</i>
V Cobán	1500-2000	1200-1400	20-24	70-80	<i>Piedra caliza</i>	15°19'14"	91°28'13"	<i>Bosque Húmedo Montano Bajo Subtropical</i>

3.2.2 Ubicación y descripción del área de trabajo

Por la naturaleza de la investigación, se realizó bajo condiciones de laboratorio en ANACAFE, ubicado en la zona 14, ciudad de Guatemala. Algunos procesos en el laboratorio de la Facultad de Agronomía de la USAC.

4. Objetivos

4.1 General

- Realizar la caracterización morfológica, patogénica y bioquímica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados al cultivo de café (*Coffea arabica*) de diferentes regiones de Guatemala.

4.2 Específicos

- Registrar la caracterización morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados al cultivo de café (*Coffea arabica*) provenientes de diferentes regiones productoras del país.
- Determinar la patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. en frutos e hipocótilos de café.
- Evaluar el pH de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. en medio líquido malta (2%).
- Estudiar el comportamiento de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados al café en cuanto a la capacidad de utilizar ácido cítrico y tartrato de amonio con fines de determinación de especies.
- Determinar especies de *Colletotrichum* presentes en zonas cafetaleras de Guatemala.

5. Hipótesis

Los aislamientos de *Colletotrichum* spp., recolectados en diferentes plantaciones de café en Guatemala, difieren en cuanto a características morfológicas, bioquímicas y de patogenicidad y pertenecen a la especie *C. gloeosporioides*.

6. Metodología

El estudio se realizó, siguiendo las etapas 1) colecta de material enfermo (hojas, frutos y ramas) de plantas de café, 2) Aislamiento, identificación y conservación del patógeno *Colletotrichum* spp. y 3) Estudio de las características morfológicas, patogénicas y bioquímicas de los aislamientos del hongo en laboratorio.

6.1 Características morfológicas de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

6.1.1 Obtención de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de café

Fueron realizadas colectas de hojas, ramas y frutos con síntomas de necrosis, y secamiento en las puntas, en nueve zonas cafetaleras. Para la obtención de los aislamientos se tomaron partes del tejido vegetal con síntomas de la enfermedad y colonizado por el hongo, las cuales se desinfectaron con alcohol al 50% por 30 segundos, hipoclorito al 1% y agua esterilizada por un minuto. Luego, fueron transferidas a cajas de Petri con medio malta – agar e incubado por siete días, posteriormente las colonias fueron utilizadas para obtención de cultivos monospóricos. Se obtuvieron nueve aislamientos de las zonas estudiadas.

Los medios utilizados para las inoculaciones de los aislados fueron: malta agar (MAA) 2% y agar agua, este último se utilizó para la obtención de cultivos monospóricos.

6.1.2 Obtención de cultivos monospóricos

Con el hongo aislado en medio PDA (Potato Dextrosa Agar), se hizo una suspensión de conidias en agua esterilizada, luego se pasó por gasa esterilizada. Se midió la concentración de conidias por medio de un hemacitómetro y se llevó a concentración de 10^4 conidias por mL. Con una micropipeta se tomaron 25 - 50 μ L de la suspensión y se colocó en una caja de petri con medio Agar Agua por tiempo aproximado de 6-8 horas, a 25 °C. Se realizaron observaciones de las cajas petri con ayuda de microscopio compuesto. Fueron seleccionados las conidias germinados y se eligió uno de ellos que fue colocado en el centro de una caja de petri conteniendo medio malta agar (MAA).

Los cultivos monospóricos se dejaron por ocho días, para que tuvieran crecimiento adecuado, en algunos casos fue utilizado antibiótico cloranfenicol. Posteriormente, se cortaron

pequeños discos de las colonias y se almacenaron según el método de Castellani, que consiste en almacenar el hongo en agua destilada a temperatura ambiente.

6.1.3 Crecimiento micelial

Con los cultivos monospóricos en medio MAA, se tomó un disco de cada cultivo y se colocó al centro de una caja de petri de 9 cm con medio MAA (2%). Se efectuaron cuatro repeticiones por aislamiento, cada repetición consistió en una caja de petri con el hongo, bajo diseño completamente al azar, siendo la unidad experimental las cajas de Petri y la variable estudiada fue el IVCM (índice de velocidad de crecimiento micelial).

Los experimentos fueron conducidos en incubadora a temperatura de 25°C. Las mediciones de IVCM fueron realizadas cada 24 horas por un período de ocho días. El índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM) fue calculado utilizando la fórmula de Manguire, adaptada por Oliveira (1991).

$$IVCM = \sum (D - D_a) / N$$

En donde:

D = diámetro medio actual

D_a = diámetro medio del día anterior

N = número de días después de inoculados en el medio MMA.

6.1.4 Coloración de las colonias

Se utilizaron discos provenientes de los cultivos monospóricos de cada región. Se efectuaron tres repeticiones de cada uno para observar la coloración de colonia del hongo y probable variabilidad en la misma. Esta fase fue realizada en medio MAA 2%. Se registraron las características de las colonias 8 días después de la inoculación del hongo en la caja de petri.

6.1.5 Dimensión de conidias

Las conidias fueron obtenidas de colonias de cultivos monospóricos, reproducidos en medio MAA (2%) a temperatura ambiente. Con ayuda de un ocular micrométrico, se realizó lectura de la dimensión de conidias por aislamiento. Se midió ancho y largo de los mismos. Para esta prueba se tomó lectura de 25 conidias cuatro veces y se obtuvo promedio. Cada lectura fue considerada como una repetición para fin de análisis, bajo diseño completamente al azar.

6.1.6 Apariencia del micelio

La apariencia del micelio fue evaluada visualmente. Se consideró la situación de ser superficial o algodonoso. Esta es una característica cualitativa y fue observada en las cajas de petri con el hongo desarrollado, después de 8 días.

6.1.7 Formación de sectores

Los sectores son mutaciones del hongo que se observan en la colonia cuando se hace crecer en medio sintético. Son considerados como cambios de color ajenos al observado en el aislamiento inicial, a partir de material vegetal enfermo. En las cajas de petri utilizadas para determinar la coloración de las colonias, se observó la formación de sectores, esta característica se registró de igual forma a los 8 días después de la inoculación.

6.1.8 Germinación de conidias

Para observación de germinación de conidias, se realizó una suspensión de conidias una concentración de 10^5 /mL, y con ayuda de una micropipeta se depositó 50 μ L en lámina de vidrio escavada. La lámina escavada se colocó en cámara húmeda (cajas Petri con papel humedecido) para evitar la deshidratación de conidias, a temperatura de 25 °C. Para cada aislamiento, se realizaron dos repeticiones y se efectuaron lecturas de germinación de 100 conidias a cada hora para cada aislamiento, durante ocho horas. Con esos datos se obtuvieron gráficos de germinación.

6.2 Patogenicidad de los aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Con el objetivo de determinar la patogenicidad de aislamientos, se realizó la inoculación de suspensión de conidias del hongo en frutos verdes e hipocótilos de café germinados en cámaras húmedas consistentes en bandejas plásticas.

6.2.1 Patogenicidad de *Colletotrichum* spp. en hipocótilos de café

En el experimento de inoculación del hongo en hipocótilos, se utilizaron las variedades de café caturra, catuaí, pache colís y catimor. Para obtención de los hipocótilos, las semillas de dichas variedades fueron sembradas en cámaras húmedas durante un periodo de cuarenta días. Cuando los hipocótilos alcanzaron aproximadamente 5 centímetros de largo, en la fase fenológica denominada “palito fósforo” (cotiledones no abiertos), fueron seleccionados y colocados en 5 bandejas plásticas previamente desinfectadas con alcohol al 70%. En el fondo de dichas cajas, se colocó algodón estéril humedecido con agua destilada-estéril para mantener ambiente húmedo y encima se colocaron 100 hipocótilos de cada cultivar de café. Posteriormente, se hizo una suspensión de conidias de aproximadamente 10^5 por mL, de los aislamientos provenientes de Huehuetenango, Cobán, Antigua, San Marcos y Sololá. Con la ayuda de un atomizador se asperjó la suspensión de conidias a los hipocótilos contenidos en cada caja. Como testigo hipocótilos de cada variedad fueron asperjados con agua destilada-esterilizada.

Después de la inoculación, se realizaron observaciones cada 24 horas para registrar síntomas de antracnosis en los hipocótilos, por un lapso de 10 días. El criterio para evaluar la patogenicidad de los aislamientos fue considerado según Waller et al (1993), quienes indican que regularmente los aislamientos patogénicos, causan necrosis del hipocótilo y la muerte en más del 30% de las plántulas, en cuanto que aislamientos considerados no patogénicos no presentan ningún síntoma.

6.2.2 Patogenicidad de *Colletotrichum* spp. en frutos verdes de café

Para el estudio de patogenicidad de *Colletotrichum* spp. en frutos verdes de café, se utilizaron de las variedades caturra, catuaí y pache colís. Se contemplaron los aislamientos provenientes de Santa Rosa, Cobán, Antigua y Sololá. Los frutos fueron colectados en el campo

en el departamento de Santa Rosa, en la estación experimental de Anacafé. Fueron conducidos al laboratorio de fitopatología de Anacafé, desinfectados con alcohol al 50% por 30 segundos e hipoclorito al 1% por un minuto y lavados con agua destilada-esterilizada. Luego, se colocaron en cámara húmeda y fueron inoculados 100 frutos por cultivar con suspensión de conidias de 10^5 por mL, de acuerdo a lo recomendado por Varzea (1995) y Orozco (2003). La aplicación de la suspensión de conidias se hizo con la ayuda de una micropipeta y se colocó sobre cada fruto una pequeña gota. Las lecturas de síntomas de antracnosis se iniciaron al quinto día y se llevó hasta los 20 días. Como testigo se aplicó agua destilada esterilizada análogo a la inoculación de suspensión de conidias.

6.3 Caracterización bioquímica de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

6.3.1 Prueba de tartarato de amonio y ácido cítrico

Fueron estudiados 7 aislamientos colectados en diferentes zonas cafetaleras de Guatemala. Los medios de cultivo y la metodología que se utilizó fue de acuerdo con Orozco (2003).

Se utilizó el medio B, como medio base, cuya composición es $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1g; KCl, 0.2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g; bromocresol púrpura, 0.05g. El medio base fue suplementado con tartarato de amonio (1% p/v) y ácido cítrico.

El pH de los diferentes medios fue ajustado a 4.5 previo al proceso de esterilización. Se colocaron 50 mL de los diferentes medios en tubos de ensayo con los tratamientos: medio base, medio base+glucosa, medio base con citrato y medio base con tartarato. Se depositaron 3 discos de 5 mm de diámetro conteniendo el hongo de cada aislamiento crecido previamente en medio MAA. Se realizaron lecturas visualmente, 8 días después de la inoculación se observó el cambio de coloración de los medios de claro a oscuro.

6.3.2 Análisis de pH del medio líquido de crecimiento de los aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Para estudiar el cambio de pH de los aislamientos en medio de cultivo *in vitro* fue utilizado medio líquido malta (2 %), el pH del medio inicial fue de 5.4. Se evaluaron 9 aislamientos, dos de Santa Rosa (Santa Cruz Naranjo y Santa Rosa de Lima), un aislamiento de los departamentos de Quetzaltenango, Alta Verapaz (Cobán), Guatemala (Fraijanes), Sololá, San Marcos, Escuintla y Sacatepéquez (Antigua). Se colocaron 25 ml del medio líquido en erlenmeyer de 100 ml y fueron autoclavados para su esterilización. Posteriormente, 5 discos de 5 mm de diámetro que contenían el hongo de cada aislamiento fueron colocados en dicho medio. Los erlenmeyers se dejaron a temperatura ambiente por 15 días y luego, se obtuvo el medio líquido sin el hongo y se midió el pH con la ayuda de un potenciómetro.

7. Resultados

7.1 Caracterización morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados al cultivo de café (*Coffea arabica*) provenientes de diferentes regiones productoras del país

7.1.1 Aislamientos estudiados

Se estudiaron nueve aislamientos del hongo provenientes de nueve zonas cafetaleras de Guatemala, información que se presenta para cada aislamiento en el cuadro 2. Para la obtención de los aislamientos, fragmentos del material vegetal enfermo colectado fueron desinfectados con alcohol al 50% por 30 segundos e hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, luego transferido a cajas de Petri con medio Malta Agar (2%), en donde se dejaron por 7 días a temperatura de 25°C.

Después de los 7 días, se presentó el crecimiento del patógeno y con ello se purificó la colonia, obteniendo solamente el hongo en estudio. Estas colonias fueron utilizadas y se obtuvieron nueve cultivos monospóricos, los cuales fueron utilizados en la caracterización final.

7.1.2 Coloración de colonias y formación de sectores

Se observó alta variabilidad en la coloración de colonias de los aislamientos estudiados. El color de colonia de los aislamientos fue ceniza oscuro y claro (Figura 5). La característica de color original, también varió a través del tiempo y luego de manipulación en el laboratorio. En aislamientos de café de Brasil caracterizados por Orozco (2003), se enfatiza que el color de la colonia de *Colletotrichum* no es una característica confiable para determinar especie y que réplicas continuas del hongo favorecen el cambio de color. Esto permite afirmar que el hongo pierde sus características culturales iniciales conforme se manipula. Basado en color, los aislamientos de coloración blanca y ceniza corresponde a *Colletotrichum gloeosporioides*. Waller et al, (1993) citan que aquellos de color verde pertenecen a *C. kahawae*, no obstante, dicha característica también es observada en aislamientos de *C. gloeosporioides*.

En cuanto a formación de sectores en las colonias de los aislamientos, tres de los siete aislamientos estudiados presentaron dicha característica. Se manifestó en los aislamientos procedentes de Cobán, San Pablo, San Marcos y Escuintla. Tal manifestación, fue observada a

los 8 días después en cultivo *in vitro*. Esta pérdida de la condición inicial, se debe a mutaciones del hongo en el medio artificial, esto coincide con lo descrito por Várzea (1995) y Orozco (2003).

Cuadro 2. Datos de origen de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. utilizados en la caracterización morfológica, patogénica y bioquímica de dicho patógeno, ANACAFE, 2007.

Aislamiento	Lugar de procedencia	Órgano vegetal	Fecha
1	Santa Rosa de Lima	Hoja	Agosto, 2006
2	Cobán	Fruto	Enero, 2007
3	Antigua	Hoja	Febrero, 2007
4	Sololá	Hoja	Agosto, 2006
5	Fraijanes	Hoja	Septiembre, 2006
6	Escuintla	Hoja	Enero, 2007
7	San Pablo, San Marcos	Hoja	Octubre, 2007
8	Huehuetenango	Fruto	Marzo, 2007
9	Quetzaltenango	Hoja	Noviembre, 2006

7.1.3 Aspecto del micelio

El 50% de los aislamientos estudiados presentó aspecto de micelio superficial mientras que el 50% presentó aspecto algodonoso y de color blanco (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características morfológicas de aislamientos de *Colletotrichum* spp., procedentes de zonas cafetaleras de Guatemala, ANACAFE 2007.

Aislamiento	Origen	Color de colonia	Aspecto del micelio	Formación de sectores	Dimensión de conidias (µm)	IVCM
1	Santa Rosa	Ceniza-oscuro	Algodonoso	-	14.48 X 5.01	1.08281
2	Cobán	Ceniza-oscuro	Superficial	+	14.49 X 4.79	1.02031
3	Antigua	Blanco	Superficial	-	14.96 X 4.23	1.01719
4	Sololá	Ceniza-oscuro	Algodonoso	-	18.98 X 4.66	0.99375
5	Fraijanes	Blanco	Superficial	-	14.53 X 4.54	1.10469
6	Escuintla	Ceniza-oscuro	Algodonoso	+	12.11 X 4.76	0.92969
7	San Pablo, San Marcos	Ceniza-oscuro	Algodonoso	+	13.85 X 4.44	1.06563
8	Huehuetenango	Ceniza-oscuro	Superficial	-	-----	1.06875

IVCM = índice de crecimiento micelial

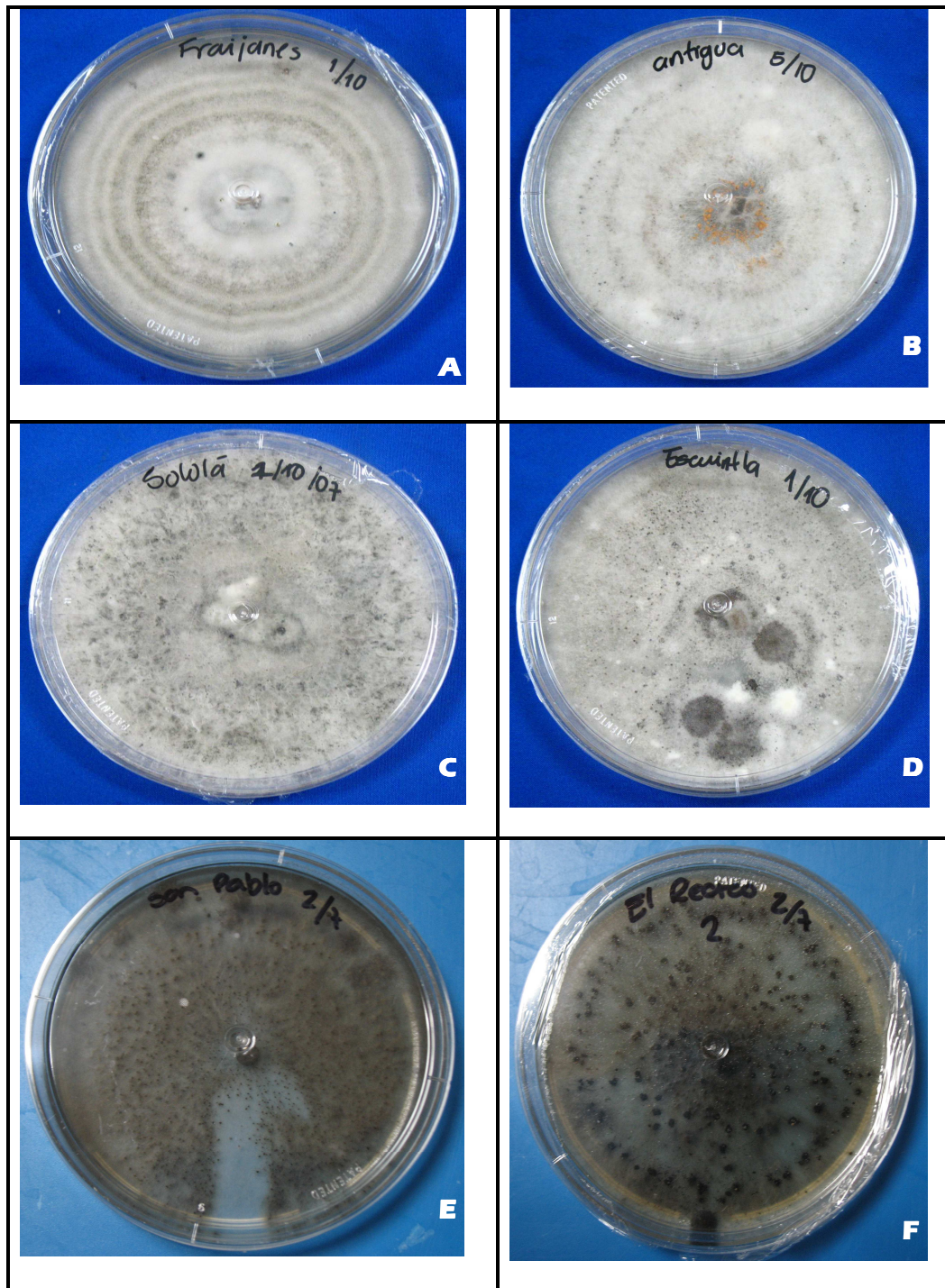


Figura 5. Características morfológicas de aislamientos de *Colletotrichum* spp. se muestra color de colonia, formación de sectores y aspecto de micelio. A) Aislamiento procedente de Fraijanes, B) Antigua, C) Sololá, D) Escuintla, E) San Pablo, San Marcos y F) Santa Rosa. ANACAFÉ 2007.

7.1.4 Crecimiento micelial *in vitro*

El crecimiento diario de las colonias de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. fue diferente. En el análisis de varianza para la variable IVCM (cm), hubo diferencia significativa entre los aislamientos (Cuadro 4). El coeficiente de variación fue de 3.82. Se cuantificó IVCM de 1.045 cm a 25°C. El aislamiento 5 (Fraijanes) presentó el IVCM medio más alto (1.10469) y similar a este, los aislamientos 1 (Santa Rosa), 7 (San Marcos), y 8 (Huehuetenango) (Cuadro 5). Orozco (2003), evaluó IVCM de aislamientos de Brasil, con cuatro diferentes temperaturas y citó que a 25°C el IVCM es mayor, con una media de 1.001 cm mientras que a temperatura de 15 y 30°C la media fue de 0.68 y 0.67 respectivamente; a 20°C el IVCM fue de 0.88 y constituye un crecimiento intermedio, información que es análoga a los obtenidos en este estudio.

Según Varzea (1995) aislamientos de crecimiento rápido corresponden a *C. gloeosporioides*, mientras que los de crecimiento lento a la especie *C. kahawae*. De acuerdo con esta característica, los aislamientos de Guatemala estudiados corresponden a la especie *C. gloeosporioides*.

Cuadro 4. Análisis de varianza para IVCM de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr
<i>Tratamiento</i>	7	0.09017456	0.01288208	8.20	0.0001
<i>Error</i>	24	0.03768555	0.00157023	-----	-----
<i>Total</i>	31	0.12786011	-----	-----	-----

C.V = 3.82%

Cuadro 5. Índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM) de aislamientos de *Colletotrichum* spp., en medio malta-agar a 25°C, provenientes de plantaciones cafetaleras de Guatemala, ANACAFE, 2007.

Aislamiento	IVCM (cm)	Grupo Tukey ($p \leq 0.05$)
Santa Rosa de Lima	1.08281	A
Cobán	1.02031	A
San Pablo, San Marcos	1.06563	A
Fraijanes	1.10469	A
Antigua	1.01719	A
Huehuetenango	1.06875	A
Sololá	0.99375	B
Escuintla	0.92969	C

No existe diferencia significativa de IVCM entre aislamientos con la misma letra, según comparación de medias a través de prueba de Tukey $p \leq 0.05$.

7.1.5 Dimensión de conidias

Los aislamientos de *Colletotrichum* spp. estudiados, presentaron variación en relación al largo y ancho de las conidias. Según análisis de varianza para la variable largo hubo diferencia significativa entre aislamientos (Cuadro 6). El coeficiente de variación para el largo de las conidias fue de 1.35 y la media de 14.77 μm . El aislamiento de Sololá presentó el mayor tamaño con 18.98 μm y el aislamiento proveniente de Escuintla el menor tamaño con 12.11 μm .

Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable largo de conidias de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr
<i>Tratamiento</i>	6	103.60914286	17.26819048	434.19	0.0001
<i>Error</i>	21	0.83520000	0.03977143	-----	-----
<i>Total</i>	27	104.44434286	-----	-----	-----

C.V = 1.35

En el análisis de varianza para la variable ancho de conidias, también se obtuvo diferencia significativa. En este caso, el coeficiente de variación fue de 3.07 y la media de ancho de conidia 4.63 μm . El aislamiento procedente de Santa Rosa fue quien presentó el mayor ancho de conidia (5.01 μm) según el análisis realizado mientras que el aislamiento de Antigua presentó el menor ancho de conidia (4.23 μm) (Cuadro 7). Según estudios realizados por Orozco (2003), en aislamientos de *Colletotrichum* de Brasil las conidias del hongo presentaron un ancho de 5.00 μm y corresponde según esta característica a la especie *Colletotrichum gloeosporioides*.

Cuadro 7. Análisis de varianza para ancho de conidias de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr
<i>Tratamiento</i>	6	1.56777143	0.26129524	12.88	0.0001
<i>Error</i>	21	0.42600000	0.02028571	-----	-----
<i>Total</i>	27	1.99377143	-----	-----	-----

C.V. = 3.07%

Cuadro 8. Dimensiones (ancho y largo) de conidias de aislamientos de *Colletotrichum* spp. provenientes de áreas cafetaleras de Guatemala, ANACAFE, 2007.

Aislamiento	Ancho (μm)	Largo (μm)
Santa Rosa de Lima	5.01 A	14.48 C
Cobán	4.79 A	14.49 C
San Pablo, San Marcos	4.44 C	13.85 E
Sololá	4.66 B	18.98 A
Fraijanes	4.54 B	14.53 B
Escuintla	4.76 B	12.11 D
Antigua	4.23 D	14.95 B

No existe diferencia significativa en la dimensión de conidias entre aislamientos con la misma letra.

7.1.6 Porcentaje de germinación de conidias

El porcentaje de germinación fue evaluado en 5 aislamientos y fue anotado el número de conidias germinadas a cada hora, durante un período de 8 horas, en lámina excavada en cámara húmeda, en condiciones de laboratorio. Las conidias del aislamiento de *Colletotrichum* de Cobán, iniciaron la germinación una hora después de iniciado el experimento. Entre tanto, las conidias de los aislamientos procedentes de Santa Rosa, San Marcos y Sololá a las dos horas. Las conidias del aislamiento de Antigua Guatemala iniciaron su germinación tres horas después.

Las conidias de *Colletotrichum* spp. germinaron 100% en agua a concentración de 10^5 conidias/mL a 25°C en un período de tiempo de 8 a 10 horas. Respecto a esto, Orozco (2003) cita que los aislamientos evaluados a temperaturas mayores del 20°C varían la germinación de 50% a 100%, y el bajo número de conidias germinadas es debido a la auto inhibición por parte del hongo debido a la alta concentración de conidias ($> 10^7$ conidias/mL) y la temperatura bajo la cual se lleva el estudio.

Se pudo constatar que, todos los aislamientos esporularon luego de un periodo de siete a ocho horas después de haber colocado la concentración en lámina excavada (Figura 6).

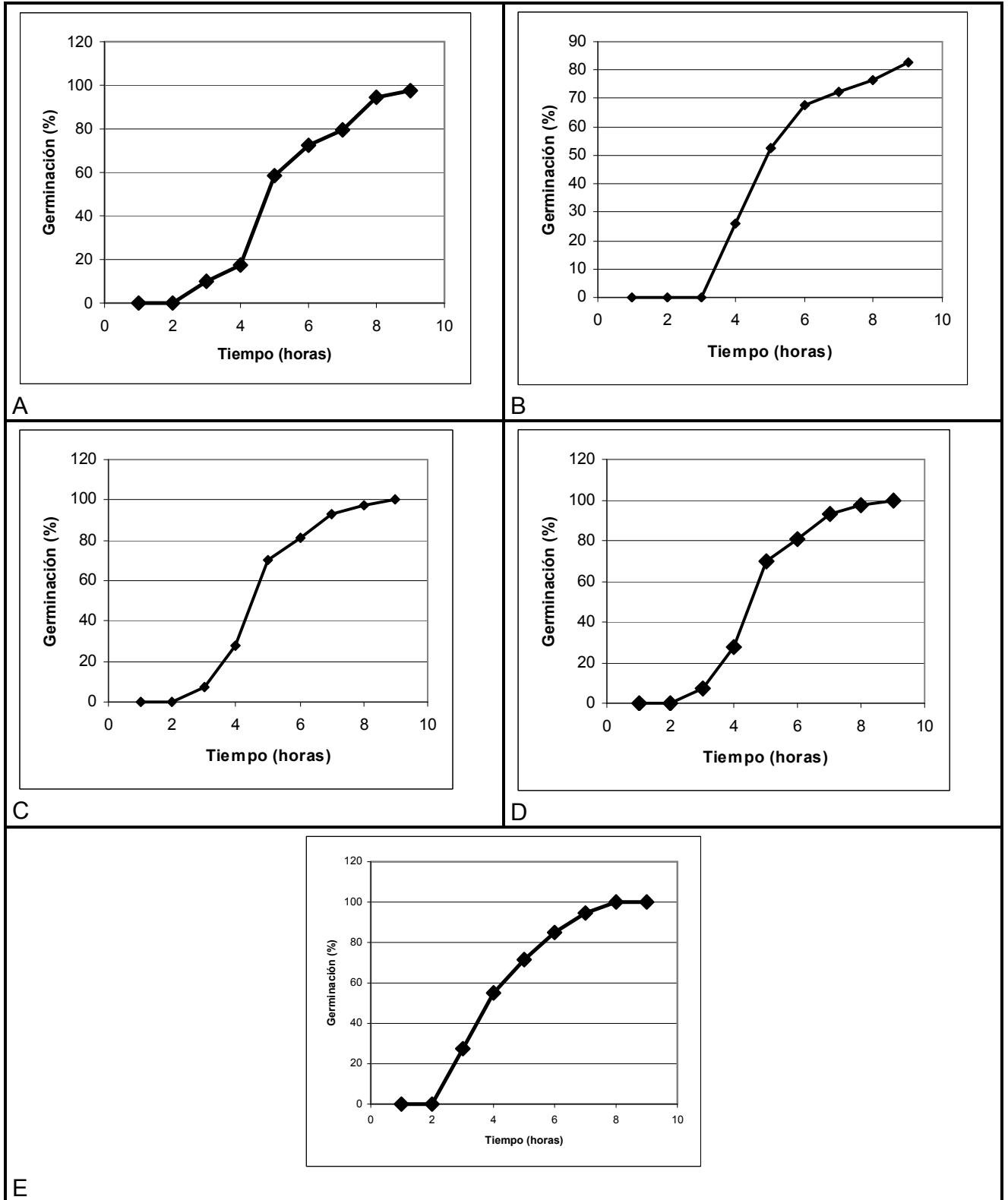


Figura 6. Curvas de germinación de conidias de aislamientos de *Colletotrichum* spp. en el cultivo de café procedente de cinco zonas cafetaleras. A) Santa Rosa, B) Antigua, C) San Marcos) D) Cobán y E) Sololá. ANACAFE, 2007.

7.2 Determinación de la patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. en frutos e hipocótilos de café

7.2.1 Evaluación en hipocótilos

En la evaluación realizada a partir de inoculación de suspensión de conidias en hipocótilos de café. No se pudo obtener una conclusión de patogenicidad basada en síntomas, algo que se menciona en la literatura para la especie *C. kahawae*. Si se toma en consideración el criterio de Waller et al. (1993), quienes indican que para considerar un aislamiento como patogénico, debe ocasionar necrosis o muerte en más del 25% de hipocótilos inoculados con el hongo y aquellos que ocasionan menos de 25% de necrosis en los hipocótilos son considerados no patogénicos. Basado en este criterio, los aislamientos procedentes de zonas cafetales de Guatemala, se consideran no patogénicos debido a que no se observó antracnosis. Sin embargo, lo acontece en el campo y basado en la evaluación realizada en frutos, se sabe que ocasiona problemas de antracnosis y probablemente las condiciones de evaluación no fueron las óptimas requeridas para la especie *C. gloeosporioides*.

Para determinar si hubo colonización del hongo en tejidos de la planta, se tomaron fragmentos de hoja, raíz y tallo de los hipocótilos inoculados en cada tratamiento (aislamientos del hongo y cultivares de café inoculados) y se sembraron en medio MAA, incluyendo el testigo (inoculación con agua). Luego de 3 días de la inoculación, a partir de los fragmentos provenientes de hipocótilos inoculados con el hongo, se observó crecimiento del hongo (micelio) en las siembras realizadas. A los ocho días después de la siembra, cada parte del tejido presentó crecimiento del hongo *Colletotrichum*, pudiendo afirmar que si hubo penetración y colonización del hongo en tejidos de hipocótilos de café. En los fragmentos procedentes del testigo, no hubo crecimiento del hongo. La parte en la que más se observó este crecimiento fue en el tallo. Con ello se demuestra que la inoculación del hongo en los hipocótilos de café, fue bien realizada y probablemente no sea una buena prueba para determinar la patogenicidad de aislamientos para esta especie de hongo o que se necesiten condiciones especiales o mayor tiempo para la manifestación de síntomas.

En la determinación de la colonización de tejidos, en fragmentos de la planta que fueron cultivados *in vitro*, se observó la formación de peritecios en los aislamientos 4 (Sololá) y con las variedades Pache colís y catimor y el aislamiento 8 (Huehuetenango) en las variedades catuaí y caturra, treinta días después de la inoculación.

7.2.2 Evaluación en frutos

Los primeros síntomas de necrosis fueron observados cuatro días después de haber aplicado el hongo, en menos del 20% de frutos de café. Orozco (2003), observó los primeros síntomas en frutos de café a los 6 días después de la inoculación del hongo en frutos con la especie *C. kahawae*, entretanto, para la especie *C. gloeosporioides*, fue de 9 a 16 días. Estos síntomas consistieron en manchas de color oscuro en el centro del fruto en donde fue aplicado el inóculo. Estas manchas fueron aumentando en diámetro día a día hasta alcanzar el 100% de necrosis en cada fruto. A los veinte días después de la inoculación, el 70% de frutos estudiados se encontraban necrosados. Es conveniente observar si situaciones similares ocurren en el campo.

Los aislamientos estudiados en la evaluación son patogénicos utilizando el criterio de Waller et al. (1993), ya que se produjo síntomas y signos de antracnosis en más del 25% de frutos de café.

Feitosa et al. (1977) estudiaron varios aislamientos obteniendo valores máximos de 23% de frutos necrosados mientras tanto Dorizzoto (1993) obtuvo valores máximos de 71%, 35 días después de la inoculación. Orozco (2003) obtuvo valores máximos de 28% de frutos con necrosis de 6 a 9 días después de haberlos inoculados con el patógeno. El porcentaje de frutos con antracnosis fue variado según la variedad de café utilizada, aislamiento y especie aplicada.

De acuerdo con el análisis de varianza existió diferencia significativa entre las variedades de café. Por lo que se realizó una prueba de comparación de medias para la variable antracnosis en frutos. Según prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) la variedad estudiada más susceptible al patógeno corresponde a *Catuaí* (Figura 7-D), mientras que la más resistente fue *Pache colís*, luego *Caturra*, y de acuerdo al mismo análisis, no hubo diferencia entre los valores de las últimas variedades. Este dato es interesante y parte del mejoramiento para esta variedad, puede ser a partir de la genética de la misma, que fue encontrada dentro de plantaciones de Caturra y Pache Común.

En el análisis de varianza efectuado para la variable antracnosis en frutos de café, no existió diferencia significativa. Sin embargo el valor más alto de incidencia de antracnosis en frutos corresponde al aislamiento procedente de la región cafetalera de Santa Rosa con 46.33 %, mientras que el menor valor correspondió al aislamiento de Antigua con 40.33%.

Cuadro 9. Evaluación patogénica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. en tres variedades de café. ANACAFE, 2007.

Variedad de Café	Media de frutos con antracnosis	%	Grupo Tukey ($p \leq 0.05$)
Catuaí	13.300	53.2%	A
Caturra	6.750	27.0%	B
Pache Colis	5.800	23.2%	B

No existe diferencia significativa entre variedades con la misma letra.



Figura 7. Evaluación de patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* en frutos verdes de café. A) Testigo (inoculación con agua), **B)** Testigo 20 días después de inoculado, **C)** Síntomas de frutos de variedad Catuaí inoculados después de 4 días con aislamiento proveniente de Santa Rosa y **D)** Síntomas de frutos de variedad Catuaí después de 20 días de inoculados con aislamiento proveniente de Santa Rosa, **E)** y **F)** Frutos variedad Caturra después de 4 y 20 días de inoculación con aislamiento proveniente de Santa Rosa y **G)** y **H)** síntomas en frutos de Variedad Pache Colís inoculados después de 4 y 20 días con aislamiento proveniente de Santa Rosa.

7.3 Estudio de las características bioquímicas de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados al café.

7.3.1 Comportamiento de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados al café en cuanto a la capacidad de utilizar ácido cítrico y tartrato de amonio

Fue evaluado la capacidad de los aislamientos de utilizar ácido cítrico y tartrato como únicas fuentes de carbono. A los ocho días después de la inoculación, hubo cambio de coloración en los medios. En el tratamiento en donde fue adicionado tartrato, todos los aislamientos tuvieron la capacidad de utilizar esa fuente de carbono, siendo considerada la prueba como positiva, así mismo el tratamiento en donde se adicionó citrato la respuesta fue positiva, ya que los aislamientos tuvieron la capacidad de utilizar la fuente de carbono.

Orozco, 2003 cita que la especie *C. kahawae* no puede utilizar cítrico y tartrato como únicas fuentes de carbono, mientras tanto una característica de la especie *C. gloesporioides* es que tiene la capacidad de utilizar citrato y tartrato como fuentes de carbono, por lo anterior se puede indicar que los aislamientos en estudio según esta prueba bioquímica corresponde a dicha especie patogénica.

La técnica de utilización de citrato o tartrato para separar aislamientos de *Colletotrichum* spp. es efectiva, ya que permite verificar la utilización de esas fuentes de carbono para los aislamientos del hongo. Es una prueba fácil de realizar, económica y rápida que permite determinar la especie de *Colletotrichum* asociada al cultivo de café. Puede ser recomendada y adaptada en otras evaluaciones. Resultados de la prueba en laboratorio se presenta en la figura 8.



Figura 8. Resultados de caracterización de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. con uso de citrato y tartrato de amonio.

7.3.2 pH de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados al café

Existió variabilidad entre los valores de pH de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. estudiados (Figura 9). El aislamiento con menor acidez fue el proveniente de Santa Cruz Naranjo, Santa Rosa con valor de pH de 3.95 y el aislamiento proveniente de Escuintla tuvo el valor más alto de pH con 6.15.

El 67% de los aislamientos presentaron valores de pH mayores de 5.0 y el 33% restante por abajo del 5.0. Basado en el criterio indicado por Varzea (1995), los aislamientos de *C. kahawae* tienden a acidificar el medio líquido MEA y los pertenecientes a *C. gloeosporioides* tienden a alcalinizar el medio. Los resultados obtenidos en esta prueba corresponden a la especie *C. gloeosporioides*. Pero, no es prueba sólida para diferenciar especies de *Colletotrichum*. Aspectos similares fueron observados por Orozco (2003) y Varzea (1995).

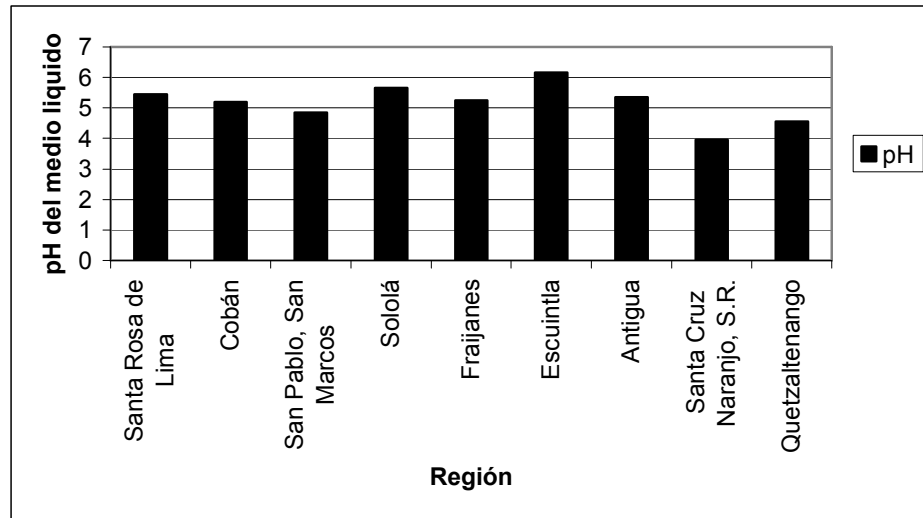


Figura 9. Comparación de pH final de aislamientos de *Colletotrichum* spp. provenientes de áreas productoras de Guatemala, ANACAFE, 2007.

8. Conclusiones

- Se determinó variabilidad morfológica entre aislamientos de *Colletotrichum* estudiados. La coloración de las colonias fue gris a blanco. Hubo diferencia significativa para las variables Índice de velocidad de crecimiento micelial y dimensión de conidias.
- Los aislamientos de *Colletotrichum* spp. estudiados fueron patogénicos cuando se realizó la inoculación de frutos verdes. La prueba en hipocótilos no fue efectiva para determinar patogenicidad. Los frutos del cultivar Pache colis y caturra fueron los menos susceptibles al hongo, mientras que el cultivar Catuaí presentó mayor incidencia de antracnosis.
- La prueba de pH no constituye un criterio sólido para caracterizar aislamientos de *Colletotrichum* procedentes de café, no obstante, los que fueron contemplados, incrementaron ligeramente el pH.
- Los aislamientos estudiados tuvieron la habilidad de metabolizar el ácido cítrico y tartrato de amonio, esto permite inferir que pertenecen a la especie *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Basado en caracteres morfológicos, de patogenicidad y bioquímicos, los aislamientos estudiados pertenecen a la especie *Colletotrichum gloeosporioides*.

9. Recomendaciones

- Realizar la inoculación de conidias del hongo en frutos verdes de café como prueba para determinar patogenicidad de aislamientos de *C. gloeosporioides* y resistencia de genotipos.
- Utilizar la prueba bioquímica de citrato y tartrato como un criterio económico, fácil y rápido de realizar para determinar especie de *Colletotrichum* asociada en el cultivo de café.
- Determinar las características moleculares de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. provenientes de las zonas productoras de café en Guatemala.

10. Bibliografia

1. ANACAFE (Asociación Nacional del Café, GT). 2006. Guia técnica de caficultura. Guatemala. 213 p.
2. Barreto Figueiredo, M. 1967. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico* 33(1):9-15.
3. Cuchet, R.; Guerrero, J. 1995. Características de los cinco cafés regionales de Guatemala. Guatemala, Ministerio de Economía / ANACAFE. 147 p.
4. Cruz S, JR De la. 1982. Clasificación de zonas de vida a nivel de reconocimiento. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. 42 p.
5. Dorizzotto, A; Abreu, MS. 1993. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum coffeanum* Noak e *Colletotrichum gloesporioides* Penz. *Fitopatologia Brasileira* 18:285-306.
6. Feitosa, MI; Feichtenberg, E. 1977. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol. São Paulo* 44(1-2):33-54.
7. Figueroa, J. 1989. Manual de recomendaciones para el cultivo del café. San José, Costa Rica, Programa Cooperativo ICAFE / MAG. 122 p.
8. Gibbs, J. 1969. Inoculations sources for coffee berry disease. *Annals of Applied Biology*. 522 p. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado, Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.
9. Hindorf, H. 1970. *Colletotrichum* spp. isolated from *Coffea arabica* L. in Kenya. *Zeitschrift fur Pflanzkrankheiten und Pflanzenschutz, Stuttgart* 77:328-331. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado, Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.
10. Holdridge, L. 1997. Clasificación de zonas de vida de Guatemala, a nivel de reconocimiento. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. 42 p.
11. ICAFE (Programa Cooperativo Instituto del Café de Costa Rica, CR); MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, CR). 1990. Manejo del cultivo de café. San José, Costa Rica. 122 p.
12. McDonald, J. 1926. A preliminary account of disease green coffee berries in Kenya colony. *Transaction of the British Mycological Society* p. 145-154. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado, Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.

13. Noack, F. 1902. As manchas das folhas dos cafeeiros. São Paulo, Brasil, Boletín da Agricultura. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tesis PhD. Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.
14. Nutman, FJ; Roberts, FM. 1964. Coffee berry disease and coffee leaf rust in Kenya. Outlook on Agriculture, Berckshire 14(2):72-79. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado, Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.
15. Oliveira, JA. 1991. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). Dissertação Mestrado em Fitossanidade. Lavras, Brasil, Universida Federal de Lavras. p. 111.
16. Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado, Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.
17. Paterson, RRM; Bridge, PD. 1994. Biochemical techniques for filamentous fungi. Surrey, International Mycological Institute. p. 55. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao Cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Minas Gerais, Brasisl. Tesis Dr. UFLA. 147 p.
18. Rayner, RW. 1948. Latent infection in *Coffea arabica* L. Nature, Lomdon/ 161(4085): 245-246. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado. Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.
19. Rayner, RW. 1952. Coffee berry disease, a survey of investigations carried out up to 1950. East Africa Agricultural Journal, Nairob 17:30-158. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado, Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.
20. Sutton, BC. 1980. The Coelomycetes. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute. p. 523-536.
21. Vargas, GE; González, U. 1972. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. Turrialba 22(2):122-135. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado, Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.

22. Várzea, VMP. 1995. Variabilidade em *Colletotrichum* spp. do cafeeiro: pesquisa de fontes de resistência ao *C. kahawae*. Lisboa, Portugal, Instituto de Investigação Científica Tropical. 128 p.
23. Wagner, R. 2001. Historia del café en Guatemala. Guatemala, Asociación Nacional del Café. 223 p.
24. Waller, J; Bridge, P; Black, R; Hakazit, G. 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. Mycological Research, Cambridge 97(8):994. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado, Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.
25. Wellman, F. 1957. Blister spoor of arabica coffee from virus in Costa Rica. Turrialba 7(4):113-123. Citado por: Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado, Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.