

IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE *COLLETOTRICHUM* RESPONSABLE DE LA ANTRACNOSIS EN LA MORA DE CASTILLA EN LA REGIÓN CAFETERA

Identification of *Colletotrichum* specie responsible for anthracnose of Andean blackberry in crops grown in Colombia

RESUMEN

La antracnosis, causada por diferentes especies del género *Colletotrichum*, es una enfermedad que ocasiona pérdidas entre 53% y 70% en cultivos de mora (*Rubus glaucus*) en Colombia. Para el control de esta enfermedad se requiere conocer la sintomatología en los cultivos e identificar y caracterizar el agente causal. Se llevó a cabo la colecta, cultivo y aislamiento del hongo, obtenido en cultivos de los departamentos de Risaralda, Caldas y Quindío, se inició la caracterización de 7 aislamientos de *Colletotrichum spp.*, mediante la utilización de marcadores ITS (Internal Transcribed Spacers), y la evaluación de la patogenicidad de los aislamientos.

PALABRAS CLAVES: Antracnosis, *Colletotrichum*, mora de castilla (*Rubus glaucus*).

ABSTRACT

Anthracnose is a disease that affects 53% to 70% of the Andean blackberry (Rubus glaucus) crops grown in Colombia. It is caused by various species of Colletotrichum spp. To generate an integrated control of the disease it is necessary to know the symptoms among crops and to identified and characterized the causal agent of Anthracnose. To obtain the monosporic fungus for culturing, storage and isolation, field samples were collected in Risaralda, Caldas and Quindío departments. The characterization of the seven isolates of Colletotrichum was conducted with molecular markers, ITS (Internal Transcribed Spacers), and pathogenicity among isolates was evaluated.

KEYWORDS: Anthracnose, *Colletotrichum spp.*, Andean raspberry (*Rubus glaucus*).

1. INTRODUCCIÓN

Los frutales tropicales se perfilan como una de las mejores opciones en la agricultura Colombiana por el crecimiento de la demanda nacional e internacional que se ha reportado en 3.75% anual en los últimos cuatro años y por la activación de la industria post-cosecha (jugos, mermeladas, etc.), cuya demanda es suplida en la actualidad por importaciones [1]. La especie *Rubus glaucus*, conocida comúnmente como mora de castilla, ha sido identificada como uno de los frutales con mayor potencial de desarrollo en la zona Andina colombiana, sin embargo este cultivo no ha adquirido el grado de desarrollo deseado, debido a la falta de un sustento tecnológico adecuado y a la falta de esfuerzos de mejoramiento. Los productores de mora en los departamentos de Caldas, Risaralda y Quindío, están enmarcados dentro de una economía campesina, empleando mano de obra familiar y contratación de personal en época de cosecha. Los cultivos se manejan en forma tradicional, generalmente con escasa aplicación de tecnología, lo que se refleja en el alto uso de plaguicidas

químicos con un impacto negativo en el ambiente y en la salud humana. De esta manera ya que el cultivo de la mora constituye un renglón importante en la generación de empleo en la región, requiere de una demanda permanente de tecnología en el campo científico y socio económico [2, 4].

En los últimos años el cultivo de la mora ha presentado numerosos problemas fitosanitarios. La antracnosis, causada por *Colletotrichum spp.*, ha alcanzado una incidencia promedio de 52,9% en los cultivos de la zona cafetera, seguida por el mildew polvoso (*Oidium sp.*) 42,50% y el moho gris (*Botrytis cinerea*) 42,35% [2]. Estos problemas han afectado fuertemente la economía de los cultivadores de la zona.

La especie *Glomerella cingulata*, teleomorfo de *Colletotrichum gloeosporioides*, fue identificada como la causante de la enfermedad de antracnosis que destruye las cañas de la mora de Castilla en la región andina de Venezuela [3]. El patógeno produce lesiones de color castaño-claro encerradas por un borde castaño-oscuro.

MARTA L. MARULANDA A.

Bióloga, Ph.D.
Profesora Titular
Universidad Tecnológica de
Pereira
ubioteve@utp.edu.co

LILIANA ISAZA V.

Administradora del Medio
Ambiente, candidata a M.Sc.
Asistente de Investigación
lilisaza@utp.edu.co

ANA MARIA RAMIREZ T.

Ecóloga, candidata a M. Sc
juanamrato@gmail.com

**GRUPO DE BIODIVERSIDAD
Y BIOTECNOLOGÍA,
FACULTAD DE CIENCIAS
AMBIENTALES,
UNIVERSIDAD
TECNOLÓGICA DE
PEREIRA.**

Las lesiones usualmente se inician en la porción basal de las espinas y en los sitios de inserción de las ramas, los pecíolos y los pedúnculos [3], luego se produce el secamiento y la muerte de la planta, esta enfermedad es también conocida en Colombia como “Tuna negra” [4]. Sin embargo, en Colombia no se tiene claridad sobre el verdadero agente causal de la enfermedad. Puede encontrarse más de una especie atacando frutos u otros órganos de un mismo hospedante [5]. En condiciones de invernadero también produce lesiones en el estolón y en los frutos, causando importantes pérdidas de la cosecha [6]. Otras investigaciones en *Rubus glaucus* en el Valle del Cauca [7] después de analizar los aislados colectados, con secuencias ITS (Internal Transcribed Spacers) de manera preliminar concluyen que el agente causal de la antracnosis es *Colletotrichum acutatum*.

Se han desarrollado muchos trabajos para determinar la complejidad genética de aislamientos de *C. gloeosporioides* que infectan frutas tropicales y subtropicales, hay diferentes métodos moleculares aplicados al estudio de este hongo, debido a que los criterios morfológicos y taxonómicos no son lo suficientemente precisos para discriminar entre especies [8, 9, 10]. La secuencia GcpR1 repetitiva de AND nuclear de *Colletotrichum lindemuthianum* y la secuencia A1T-rich de DNA han sido utilizadas para agrupar varios aislamientos de *C. gloeosporioides* obtenidos en fresas [11]. El análisis con primers-PCR arbitrarios (AP-PCR) se ha utilizado también para diferenciar aislamientos de *C. gloeosporioides* de fresa [9, 11]; estos mismos marcadores se han usado en aislamientos obtenidos en otras frutas tropicales como cítricos, aguacates, mangos y papayas [6, 9, 12, 13, 16]

Los marcadores ITS -Internal Transcribed Spacers- (ITS1 e ITS2) y el gen 5.8S rRNA fueron utilizados para identificar 80 aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos en cultivos de fresa, también se reporta que el uso de la enzima endonucleasa MvnI, permitió diferenciar entre *Colletotrichum fragariae* y *Colletotrichum gloeosporioides*, ambos hongos son responsables de la antracnosis en fresa, los cuales son fenotípicamente indistinguibles [5, 9, 14].

Para el control de la enfermedad es necesario conocer la sintomatología y las características del agente causal, en vista de los pocos estudios realizados en el Eje cafetero en mora de castilla, se pretende muestrear, aislar y caracterizar morfológica y genéticamente el hongo en diferentes cultivos de mora con y sin aguijón en los departamentos de Caldas, Quindío y Risaralda.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colección de muestras

Se obtuvieron muestras de hojas, ramas y frutos con los síntomas típicos de la enfermedad (Figura 1). El

muestreo se realizó en diferentes fincas de municipios del eje cafetero, conocidos por su producción de mora de castilla, el material colectado incluyó plantas de mora con y sin aguijón, las muestras fueron marcadas y preservadas en nevera. La tabla 1 muestra los municipios con sus respectivas veredas, en donde se colectaron plantas afectadas por antracnosis.

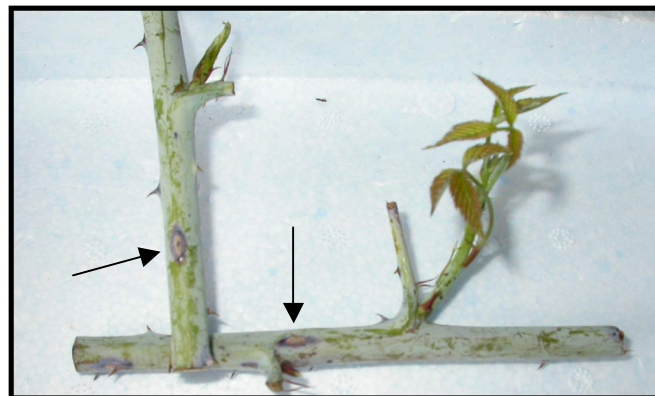


Figura 1. Síntomas de antracnosis en tallos de mora.

DEPARTAMENTO	MUNICIPIO VEREDAS	No. AISLAMIENTO.	OBSERVACIÓN
Caldas	Salamina	1	Con aguijón
Risaralda	Pereira, La Bella	2	Con y sin aguijón
Risaralda	Santuario, Planes de San Rafael	3	Con y sin aguijón
Quindío	Salento, Navarco Alto	4	Con aguijón
Caldas	Villa María, La Paz	5	Con aguijón
Risaralda	Santa Rosa, La Paloma, San José	6	Sin aguijón
Risaralda	Desquebradas, Rivera Alta	7	Sin aguijón

Tabla 1. Sitios de colecta de *Colletotrichum spp.* en cultivos de mora

2.2. Aislamiento del hongo

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Ambientales de la UTP, se hicieron cortes de las manchas oscuras que indican la presencia del hongo, así como de los aguijones afectados, esto fueron puestos en etanol al 70 % durante un minuto y lavados con agua destilada estéril, los aislamientos se obtuvieron por siembra directa en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), acidificado con ácido láctico. En caja de petri fueron sembradas cinco partes de material vegetal infectado, puestas en incubadora a 23 °C (Figura 2).

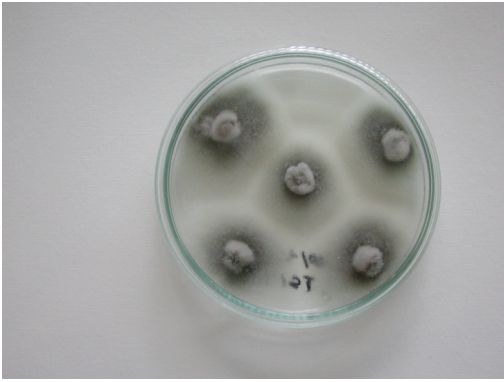


Figura 2. Aislamientos de *Colletotrichum sp* provenientes de cultivos de mora, cultivados en medio PDA

Posteriormente, para obtener cultivos monospóricos, con un sacabocados se tomaron esporas del aislamiento puro y se sembraron por agotamiento en tubos de ensayo con medio PDA (Figura 3).

Los tubos fueron puestos en incubadora a 23°C en completa oscuridad.



Figura 3. Crecimiento del hongo por agotamiento

2.3 Pruebas de patogenicidad

Se preparó una suspensión de esporas agregando agua destilada estéril a las cajas petri para resuspender las esporas, posteriormente es filtrado en gasa para evitar el paso de micelio y de medio.

Para la inoculación se utilizaron estacas de 15 cm., hojas y frutos de plantas de mora sanos con y sin agujón, se realizaron tres repeticiones por tratamiento, los tratamientos efectuaron fueron:

- Punción de estacas: Mediante aguja hipodérmica, se realizaron ocho punciones, seguidamente se asperjó con la suspensión del hongo (Fotografía 4).
- Método de herida: Se realizó un corte con bisturí, allí fueron puestos fragmento de medio PDA con hongo, finalmente fueron sellados con papel vinilpel.
- Punción en hojas: Se realizaron ocho punciones a los tres folíolos igual que a las estacas ya descritas anteriormente.

d. Aspersión en fruto.

En todos los tratamientos se hicieron controles con material vegetal con y sin herida, asperjados solo con agua estéril. Los cuatro tratamientos fueron puestos en cámara húmeda a 23 °C, bajo condiciones de oscuridad durante 15 días.



Figura 4. Método de punción de estacas

Para la evaluación de las pruebas de patogenicidad, se realizó una escala con el grado de lesión presentada (manchas de coloración café) así:

- 0 Sin síntomas.
- 1 Síntomas leves.
- 2 Varios lesiones (Coalescencia).
- 3 Deterioro total (Muerte de tejidos).

Las evaluaciones para todas las pruebas se realizaron cada dos días durante 15 días.

2.4 Caracterización de los aislamientos con marcadores ITS (Internal Transcribed Spacers)

La caracterización de la diversidad genética de los aislamientos de *Colletotrichum* se realizó siguiendo la metodología descrita por [14, 15, 16]

2.5 Amplificación de la región ITS

Se realizará la amplificación con los cebadores universales de la región conservada del gen ADNr [16,17] y la cual involucrará tres cebadores ITS 1, ITS 4 e ITS 2. Para identificar el patógeno se utilizarán los cebadores específicos CgInt y CaInt2, estos últimos combinados con la secuencia ITS, ITS4 [16].

2.6 Caracterización de Cepas

Finalmente se hará un análisis con enzimas de restricción (PCR-RFLP) [7, 8, 15, 16], la visualización de los fragmentos se realizará en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento y cultivo del hongo, y caracterización morfológica.

Se obtuvieron 14 aislamientos de diferentes sitios del eje cafetero, luego de 72 horas de incubación se observa el inicio de crecimiento del hongo, al cabo de ocho días se observó un completo crecimiento del hongo, identificándose sus estructuras reproductivas.

Se identificaron dos tipos de crecimiento del hongo, crecimiento rápido y micelio gris con relieve ondulado y crecimiento lento con micelio blanco grisáceo, abundante y esponjoso; estos tipos de crecimiento coinciden con los descritos por [17] en estudios sobre la infección de *Colletotrichum gloeosporoides* en guanábana en el Valle del Cauca, aunque la autora menciona otro tipo de crecimiento con esporulación rápida de color naranja, al parecer asociado a otra especie de *Colletotrichum*. Es frecuente encontrar asociación de dos especies de *Colletotrichum*, (*C. gloeosporoides* y *C. acutatum*) como es el caso de Olivo [18], en el que encontraron las dos especies. Así mismo, [7, 21] en estudios realizados en Colombia se han encontrado las dos especies del hongo, en 83 aislamientos monospóricos de *Colletotrichum spp.* procedentes de cultivos de mora de 10 municipios del Valle del Cauca.

3.2 Pruebas de Patogenicidad

La primera evaluación realizada a los dos días (48 H) de la inoculación no muestra síntomas ni signos de la enfermedad en los tejidos analizados; al cabo de cuatro días (96 H), se empiezan a notar los primeros síntomas de enfermedad, como lesiones necróticas en todos los ensayos realizados, con los diferentes tipos de tejido, como tallos, hojas y frutos. En peciolos de fresa inoculados con *C. fragariae*, la germinación de conidios y formación de apresorios ocurrió entre 6-16 h y 12-24 h después de la inoculación [19]. La penetración del hongo fue directa a través de las células epidermales y las basales de los tricomas [20].

En los ensayos realizados en pruebas de laboratorio utilizando frutos, hay abundante presencia del hongo, con abundante esporulación a los cuatro días (96 H). Los resultados coinciden con los de otros autores [3, 7, 21] quienes en investigaciones en antracnosis en mora describen que los síntomas en tallos empiezan cuatro días después de la inoculación con lesiones café oscuras alrededor del sitio de inoculación, sin embargo los mismos autores describen que en frutos, la presencia del hongo sólo ocurrió después de los 10 días.

En la actualidad se está evaluando el efecto del hongo, sobre diferentes porciones de las plantas de mora, en pruebas de laboratorio, de los diferentes aislamientos del

hongo colectados con el fin de determinar cuál de ellos tienen una mayor patogenicidad sobre la planta.

3.3 Caracterización de los aislamientos con marcadores ITS (Internal Transcribed Spacers)

De acuerdo con la descripción de [15,16], la amplificación directa de secuencias de ADN ribosomal de hongos, tiene importantes aplicaciones para aclarar problemas filogenéticos y taxonómicos, esta técnica ha sido utilizada para la caracterización de aislamientos de *Colletotrichum* asociados a antracnosis en muchas frutas tropicales y subtropicales.

En este trabajo se realizó la extracción de ADN de los aislamientos de *Colletotrichum spp* obtenidos en cultivos de mora de la región, se evaluó la calidad y concentración del ADN de cada una de las muestras, se obtuvo ADN de buena calidad y en concentración suficiente para la evaluación con los ITS.

Se realizaron pruebas preliminares con los cebadores ITS 1 e ITS 2, según lo descrito por [7, 15], en estas pruebas se han obtenido amplificaciones positiva con todas las muestras, y con los dos cebadores ITS.

Conjuntamente con la caracterización morfológica y microscópica, la caracterización molecular permitirá determinar el agente causal de la antracnosis en mora.

La evaluación molecular aportará información muy valiosa sobre la variabilidad genética del hongo en la región cafetera, para lo cual la colecta de los aislamientos del hongo se realizó tomando datos geo-referenciados.

Todos los resultados que se obtengan en esta investigación servirán para sentarán las bases de un programa de control más efectivo de la antracnosis, es probable que se identifiquen también hongos antagonistas asociados, que en el futuro se puedan utilizar como control biológico del *Colletotrichum* y así disminuir el uso de plaguicidas.

Esta información, sumada a las pruebas de patogenicidad, será de gran utilidad para la selección de genotipos, accesiones y/o variedades de mora con tolerancia o resistencia a *Colletotrichum spp*. Estas plantas serán posteriormente evaluadas en colaboración con agricultores de Risaralda; se conocen varios trabajos en fresa y frambuesa, especies de la familia *Roseaceae* al igual que la mora, en los cuales se ha encontrado resistencia a *Colletotrichum*, [6, 22] se identificaron genes de resistencia en frambuesa y marcadores moleculares asociados con el gen de Rca 2 que otorga la resistencia para el grupo 2 de patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, que causa la antracnosis a la fresa [22].

Otros trabajos de mucha importancia en el tema de la genómica funcional en fresa [23] es el desarrollo EST (secuencias de genes expresados) y SSR (secuencias simples repetidas), se encontró un grupo de secuencias de genes putativos -1304- estos EST han sido desarrollados y las transcripciones identificadas para aspectos fisiológico y de interés económico. Los análisis de homología de las secuencias indicaron que un 89.5% son compartidas con proteínas funcionales y conocidas en otras especies de *Rosaceae*. Los EST son fragmentos de ADNc que se obtienen de secuenciar la expresión de un gen, o una cadena de RNA mensajero.

Las secuencias obtenidas por estos investigadores pueden ser utilizadas para acelerar procesos de búsqueda de genes de importancia económica tanto en *Fragaria* como *Rubus* y otras *Rosaceae*, basados en las herramientas modernas de la Bio-informática, y la genómica comparativa [23].

Tanto los resultados anteriores, sobre la presencia de genes de resistencia en fresa, como la existencia de un grupo de EST en *Fragaria*; son de gran valor para que a muy corto plazo, nuestro grupo incursione en la evaluación de los EST relacionados con la resistencia a la antracnosis en el germoplasma de mora.

Los métodos actuales de selección y búsqueda de resistencia, se basan en el aprovechamiento de las bases de datos y en la genómica comparativa, debido a que se ha demostrado que los genomas de las plantas muy cercanas filogenéticamente, comparten regiones altamente conservadas, es de esperar entonces, la existencia de genes de resistencia en *Rubus*, por pertenecer a la familia *Rosaceae*.

Hay muchos reportes sobre la presencia de un importante número de especies de *Rubus* en los Andes Colombianos [24, 25, 26]; adicionalmente ha sido documentada, mediante la utilización de marcadores moleculares, una amplia variabilidad genética intra-específica en la especie *Rubus glaucus*, como también la probable interacción genética entre las especies de *Rubus* silvestres con la especie de interés comercial [27, 28].

El amplio y diverso germoplasma de mora presente en el eje cafetero, ha sido estudiado de manera extensa por nuestro grupo utilizando marcadores moleculares RAPD, AFLP y SSR [27, 28].

4. CONCLUSIONES

Se están efectuando pruebas de patogenicidad a nivel de laboratorio, logrando estandarizar el método de inoculación en diferentes porciones de la planta en cámara húmeda, obteniendo el tiempo de aparición del hongo en los diferentes inoculados.

Se realizó la extracción de ADN, de los aislamientos en cultivo, se observó su buena calidad y concentración, se han realizado evaluaciones preliminares con los ITS, y se ha obtenido amplificación positiva.

Desde el punto de vista de la aplicación práctica de nuestros resultados y su transferencia a los agricultores se puede concluir, de manera preliminar, que antes de cuatro días de iniciado el proceso infectivo es preciso hacer un control de la enfermedad en campo. Dicho control puede contemplar la aplicación de un fungicida sistémico y la realización de podas y destrucción de ramas y tallos que se encuentren afectados, buena aireación con la poda de ramas improductivas y las ramas que ya estén fructificadas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Rodríguez. Aspectos socioeconómicos de los sistemas de producción de mora y lulo en Colombia. 2002. En: IV Seminario nacional de frutales de clima frío moderado.
- [2] M. Botero, G. Ríos, G. Franco, M. Romero, J. Pérez, J. Morales, J. Gallego, y D. Echeverry. Identificación y especialización de enfermedades asociadas a los cultivos de mora (*Rubus glaucus* Benth) en el eje cafetero. 2002. IV Seminario de frutales de clima frío moderado. pp, 87-92
- [3] M. Cedeño y P. Palacios. Antracnosis en mora de Castilla (*Rubus glaucus*) causada por *Glomerella cingulata* en Venezuela. 1991. Fitopatología Venezolana 4: 17-2.
- [4] G. Franco y M. Giraldo. El cultivo de la mora. 2002. Corpoica Regional 9. 78 pp.
- [5] S. Freeman. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: *Colletotrichum* Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction. 2000. APS Press. USA. pp: 131-144.
- [6] B. Smith y L. Black. Resistance of strawberry plants to *Colletotrichum fragariae* affected by environmental conditions. 1987. Plant Dis. 71: 834-837.
- [7] E. Alvarez .A. Arenas, J. Mejía. Molecular and pathogenic characterization of isolates of *Colletotrichum spp.* associated whit anthracnose of Andean blackberry on accessions from Valle del Cauca. 2006. CIAT Annual Report.
- [8] S. Sreenivasaprasad. P.R, Mills. B., Meehan. y A.E. Brown. Phylogeny and Systematics of 18

- Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. 1996. Genome 39:499-512.
- [9] S. Freeman y Katan, T. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. 1997. Phytopathology 87:516-521.
- [10] S. Freeman. ,. Pham y R. J. Rodriguez. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A 1 T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. Exp. Mycol. 1993. 17:309-322.
- [11] S. Freeman, y Rodríguez, R. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. 1995. Mycol. Res. 99:501-504.
- [12] P. Alahakoon, W., A. E. Brown, and S. Sreenivasaprasad.. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. 1994 .Physiol. Mol. Plant Pathol. 44:93-103.
- [13] B .Bernstein., Zehr, E., Dean, R. y Shabi. E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. 1995. Plant Dis. 79:478- 482.
- [14] P. Martínez-Culebrasa. Barrib, E. García, M y Querol, A. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the Internal Transcribed Spacers of the Ribosomal region. 2000. FEMS Microbiology Letters Volume 189, Issue 1, 1, pp 97-101
- [15] T.J, White. Bruns, T.Lees y Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 1990. In: PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. M.A Inns, D.H. Gelfand, y J.J. Sninsky ed. Academic Press, San Diego CA. p 315-322.
- [16] S, Freeman. Katan, T y Shabi, E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, no. 3 p p. 1014-1020
- [17] E. Alvarez, C. Ospina, J. Mejía y G. Llano. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Fitopatología colombiana. Vol 28 (1). 2002
- [18] R. Oliveira, J. Moral, K. Bouhmidi, A. Trapero. Caracterización morfológica y cultural de aislados de (*Colletotrichum* spp) causantes de la antracnosis del olivo. 2005. Bol san veg. Plagas 31.
- [19] R. Milholland. . Histopathology of strawberry infected with *Colletotrichum fragariae*. 1982. Phytopathology 72: 1434-1439.
- [20] K. Curry, M. Abril, J. B. Avant, y B. J. Smith. 2002. Strawberry anthracnose: histopathology of *C. acutatum* and *C. fragariae*. Phytopathology 92: pp 1055-1063.
- [21] L. Afanador, E. Alvarez, A. González. Antracnose of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.): Variability in species and races of the causal agent and identification of sources of resistance to the disease. 2006. CIAT. Annual Report.
- [22] E. Lerceteau, G. Guerin y B. Denoyes. Identification of SCAR markers linked to Rca 2 anthracnose resistente gene and their assessment in strawberry germplasm. 2005. Theor appl genet. Sep; 111 (5) pp 862-870
- [23] K. Folta, M. Staton, P. Stewart, S. Jung, D. Bies, C. Jesdurai y M. Dorrie. Expressed sequence tags (ESTs) and simple sequence repeat (SSR) markers from octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). 2005. BMC Plant Biology 5:12
- [24] E. Guerrero, y W. Vargas. Plantas del páramo de Anaime. Cordillera central, Andes colombianos. 2003. Corporación Semillas de Agua. Bogotá. 130 p.
- [25] J. Rangel. (Editor) Colombia. Diversidad Biótica III. La región de vida paramuna. 2000. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 903 p.
- [26] W. Vargas. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales. 2002. Universidad de Caldas y Corporación Autónoma Regional del Quindío. Manizales. 813 p
- [27] S. Aguilar. Caracterización de la variabilidad genética de *Rubus glaucus* en el eje cafetero utilizando AFLP. 2006. Tesis de Maestría. Universidad Tecnológica de Pereira-Universidad del Quindío-Universidad de Caldas.
- [28] M. Marulanda, A. López, S. Aguilar. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR. Crop breeding and applied and biotechnology. In press.