

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS FOLIARES ASOCIADOS A FORESTALES NATIVOS EN AGROECOSISTEMAS PREMONTANOS DE RISARALDA

JENNYFER ANDREA PAREJA SÁNCHEZ Y MÓNICA BETANCOURT VÁSQUEZ

RESUMEN

La utilidad de las especies forestales ha tenido un gran valor cultural y económico en muchas de las regiones del país. Estas especies se utilizan principalmente para extracción de la madera, sin embargo, muchos forestales presentan un gran potencial para la reforestación de ecosistemas degradados. En Colombia existe una considerable riqueza de especies forestales nativas distribuidas por todo el territorio nacional, pero, a pesar de su riqueza no se conoce muy bien la diversidad de este tipo de especies. Las especies que son más comercializadas son: *Cordia alliodora*, *Pachira quinata*, *Tabebuia rosea* y *Alnus acuminata*. No obstante, los forestales nativos se ven muy amenazados por el ataque de plagas y enfermedades, en donde los hongos fitopatógenos son el principal agente causal de muchas de las enfermedades en los cultivos. Debido a que los forestales nativos son poco estudiados, existe un gran desconocimiento de los agentes causales de las enfermedades que los afectan, lo que ha llevado consigo a realizar prácticas de manejo inadecuadas. Esta investigación tiene como objetivo caracterizar los hongos fitopatógenos asociados a forestales nativos, de acuerdo a sus estructuras microscópicas y corroborar su identidad mediante técnicas de biología molecular. Los microorganismos que se han encontrado hasta el momento son: *Pestalotia sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Alternaria sp.* Aunque es un trabajo en curso, falta realizar las pruebas de patogenicidad para corroborar que las especies anteriormente mencionadas afectan a los tres forestales nativos y posteriormente realizar la caracterización molecular para confirmar la identidad de los hongos fitopatógenos aislados.

PALABRAS CLAVE: Hongos, Fitopatógenos, Forestales, Nativos y Risaralda.

INTRODUCCIÓN:

Colombia cuenta con una amplia diversidad vegetal debido a sus condiciones climáticas y geográficas que permiten ser potencial para el sector forestal, cuyas zonas óptimas abarcan desde áreas montañosas hasta tropicales, dispuestas principalmente en plantaciones para uso comercial y reforestación (PROFOR, 2015). Para uso comercial, se manipulan mayormente forestales exóticos que pertenecen a los géneros *Pinus* y *Eucalyptus*, ya que poseen rápido crecimiento y alto rendimiento que permiten generar diversos productos importantes como madera y pulpas para la fabricación de papel y productos más relevantes como la generación de biocombustibles (Cárdenas y Salinas, 2006; Gómez *et al.*, 2012; PROFOR, 2015).

Las especies forestales nativas también han sido aprovechadas como fuentes de productos maderables y a la vez no maderables (PFNM) para la realización de artesanías y enseres. Esto contribuye al aumento de ingresos para los productores, pero la sobreexplotación de algunas de ellas ha reducido considerablemente sus poblaciones y ha generado problemas a nivel ecológico y ecosistémico en su hábitat (López, 2008; Rodríguez y Maldonado, 2008). No obstante, si se

hace un buen manejo de este tipo de especies, pueden rehabilitar áreas degradadas y conservar otras especies vegetales y animales, ya que posee cualidades para la reforestación (Montagnini, 2004).

El uso de forestales en otros sistemas como agropecuarios ha sido muy común por su adaptación a condiciones ambientales variables, además dependiendo de la especie que se escoja puede ofrecer ventajas a nivel ecológico y productivo (Montagnini, 2004). Sin embargo, el mal manejo de la tierra, las inadecuadas prácticas agropecuarias y fitosanitarias, hacen que el cultivo en general esté susceptible a agentes bióticos y abióticos.

Los hongos fitopatógenos son los principales limitantes en el desarrollo y productividad de las plantas durante muchos años, y actualmente siguen siendo un factor que genera pérdidas económicas en el país, ya que poseen alta variabilidad genética y resistencia a fungicidas (Lo Presti *et al.*, 2015). Los forestales exóticos plantados son los más afectados por diferentes especies de hongos fitopatógenos, a causa de que muchas veces se disponen en monocultivos, lo que aumenta el riesgo de ataque por parte de estos y que aparezcan nuevas enfermedades (Wingfield *et al.*, 2001).

El estudio y seguimiento de las enfermedades en forestales es muy importante para establecer medidas que prevengan o mitiguen los daños que ocasionan los hongos fitopatógenos. Sin embargo, muchos reportes que se tienen sobre estos agentes han sido provenientes de especies exóticas por la dependencia que poseen las industrias, por lo que los forestales nativos han sido poco estudiados en este aspecto (Wingfield *et al.*, 2001).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: El estudio de los hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en forestales es importante para establecer medidas de manejo y posibles soluciones que mitiguen los impactos generados sobre ellos. Su investigación en Colombia y en Risaralda se ha enfocado principalmente en forestales exóticos por ser las de mayor uso debido a sus características físicas y mecánicas (PROFOR, 2015). Sin embargo, la información referente a estos agentes en forestales nativos es muy poca, sin conocer muchos de ellos y los impactos que causan, por lo que ¿Cuáles son los hongos fitopatógenos foliares que atacan a forestales nativos, especialmente a las especies de Roble Colombiano (*Quercus humboldtii*), Nogal Cafetero (*Cordia alliodora*) y Cedro Negro (*Juglans neotropica*) que pertenecen a agroecosistemas premontanos de Risaralda?

JUSTIFICACIÓN: Este estudio servirá como base para promover la investigación sobre las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos que sufren especies forestales nativas en Colombia y el impacto que se genera sobre ellas. Además, esto permitirá que se desarrollen técnicas y protocolos correctos para el cultivo comercial de estas especies, llevando a que Colombia y el Eje Cafetero potencien la producción de productos maderables y no maderables que contribuya al mercado legal.

También se espera impulsar el manejo sostenible de los productos y servicios que ofrecen estas plantas por parte de pequeños productores, para que a largo plazo haya competitividad rural y reducción de la pobreza en familias campesinas, que son objetivos del Plan Nacional de Desarrollo 2014-2018 (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2012).

OBJETIVOS:

-Objetivo general. Caracterizar biológica y molecularmente los hongos fitopatógenos foliares presentes en las especies Roble Colombiano, Nogal Cafetero y Cedro Negro, en agroecosistemas premontanos de Risaralda.

-Objetivos específicos.

- Identificar microbiológicamente los hongos fitopatógenos foliares presentes en Roble Colombiano, Nogal Cafetero y Cedro Negro en Santa Rosa de Cabal, Risaralda.
- Evaluar la patogenicidad de los hongos fitopatógenos foliares presentes en Roble Colombiano, Nogal Cafetero y Cedro Negro en Santa Rosa de Cabal, Risaralda.
- Identificar molecularmente los hongos fitopatógenos más relevantes y que estén presentes en hojas de Roble Colombiano (*Quercus humboldtii*), Nogal Cafetero (*Cordia alliodora*) y Cedro Negro (*Juglans neotropica*), en el municipio de Santa Rosa de Cabal, Risaralda.

REFERENTE TEÓRICO: En Colombia existe una considerable riqueza de especies forestales nativas distribuidas por todo el territorio nacional, sin embargo, sigue habiendo desconocimiento en la diversidad de este tipo de especies (Gómez *et al.*, 2012). Las familias más representativas y que más usos tienen son Lauraceae y Fabaceae, pero entre las especies más comercializadas están *Cordia alliodora*, *Pachira quinata*, *Tabebuia rosea* y *Alnus acuminata* (Cárdenas y Salinas, 2006; Gómez *et al.*, 2012; Bare y Ashton, 2015).

La utilidad de las especies forestales ha tenido un gran valor cultural y económico en muchas de las regiones del país, puesto que sus productos maderables y no maderables se han caracterizado por ser resistentes y de buena calidad. A nivel comercial se resalta principalmente la extracción de madera para la fabricación de muebles, construcción de diferentes estructuras ferroviarias, chapados y elaboración de pisos; producción de artesanías como bisutería y tallas de madera; y otros usos menos importantes como la producción de biocombustibles (Cárdenas y Salinas, 2006; Rodríguez y Maldonado, 2008; Gómez *et al.*, 2012). Pero también el potencial que poseen estas especies para la reforestación de ecosistemas degradados ha sido significativo, puesto que ofrecen beneficios como el secuestro de carbono, ayuda al reciclaje de nutrientes en el suelo y favorece la conservación de la biodiversidad (Montagnini, 2004; Piotto *et al.*, 2010).

El país en general tiene cualidades para el aprovechamiento forestal, pero existen tres zonas principales en las que se pueden desarrollar proyectos de ese tipo como lo son el Eje Cafetero, Caribe y Orinoquía, en los que se plantea potenciar el uso de algunas especies nativas (PROEXPORT, 2012). Pero esto se puede ver limitado por el estado en el que se encuentran muchas poblaciones de estos forestales, ya que la descontrolada explotación de su material leñoso y el mercado ilegal de maderables ha declinado su capacidad de recuperación, hasta lograr que muchas de ellas se encuentren en categorías de amenaza considerables, además, varias de las especies que se encuentran en riesgo son endémicas (Cárdenas y Salinas, 2006). Frente a ello, se han desarrollado elementos legislativos que regulen el uso de los recursos forestales de forma sostenible pero que contribuya a la economía nacional, como es el Plan Nacional de Desarrollo Forestal (2000), además, se han generado medidas de conservación para algunas de las especies amenazadas por parte de las corporaciones autónomas del país (Cárdenas y Salinas, 2006). Por esto, aumentar el conocimiento sobre los aspectos ecológicos de los forestales nativos es importante para seguir contribuyendo a la conservación de sus poblaciones pero también lo es investigar sobre aspectos de silvicultura y manejo agronómico si se quiere promover un buen uso de ellas en sistemas forestales, por lo que conocer cuáles factores afectan a este tipo de especies

permite realizar estrategias de prevención y control para que la producción de materiales maderables y no maderables no se vea gravemente perjudicado.

En muchos forestales, el clima y el ataque por parte de plagas y enfermedades son problemas comunes, siendo estos últimos los limitantes más importantes (Jactel *et al.*, 2009). Muchos de los agentes causales de enfermedades presentes en cultivos son microorganismos patógenos como hongos, capaces de adherirse mediante estructuras de infección a la superficie del hospedero para lograr que se debilite o finalmente muera (Agrios, 1995; Lo Presti *et al.*, 2015).

Los reportes que hay sobre hongos fitopatógenos en especies forestales nativas de Colombia solo se encuentran en algunas de ellas, por lo que el estudio de las enfermedades presentes en este tipo de forestales sigue siendo poco. Por ejemplo, en el Roble Colombiano (*Quercus humboldtii*) se ha encontrado que géneros de hongos como *Pestalotia* ocasionan manchas castañas en hojas y *Fusarium* pueden causar la muerte de varios individuos, afectando ambos también a otras especies forestales (Monroy-Castro y Lizarazo-Forero, 2010). En Nogal Cafetero (*Cordia alliodora*) se ha reportado royas de la especie *Puccinia cordiae* y *Puccinia johnstonii*, pero no se especifican los síntomas que producen (Pardo-Cardona, 1998; Gómez-Correa *et al.*, 2012). También se ha hecho seguimiento al “arrosamiento” que afecta a los nogales, causando hasta la muerte de las hojas, pero su agente causal no está confirmado; *Mycosphaerella* sp puede manifestarse en forma de manchas foliares irregulares que en casos extremos puede defoliar al individuo; *Ceratocystis fimbriata* y *Fusarium* sp son de importancia económica mayor, ya que pueden ocasionar secamiento y muerte de los individuos (Ospina-Penagos *et al.*, 2010). En Cedro Negro (*Juglans neotropica*) los reportes han sido más escasos que las especies anteriores, donde solamente se ha encontrado a un hongo fitopatógeno (*Phytophthora* sp), que ocasiona daños radiculares en vivero y plantaciones jóvenes (Ospina-Penagos *et al.*, 2003).

El diagnóstico temprano de estas enfermedades y las medidas preventivas, hacen que los hongos fitopatógenos no se sigan desarrollando, por lo que estas especies no van a sufrir daños más graves que ocasionalmente mata a muchos individuos. Alternativas como la desinfestación de los materiales para la poda, la eliminación de las partes afectadas y la aplicación de fungicidas han sido lo más utilizado, pero este último no es lo más recomendable por el impacto ambiental que genera (Ospina-Penagos *et al.*, 2010). Por tal razón, la utilización de otros medios más benéficos para atacar el agente causal de la enfermedad se han implementado, como es el caso del control biológico, en donde se utiliza microorganismos como *Penicillium*, *Trichoderma* y *Azotobacter* para inhibir el crecimiento del hongo, lo que causa su muerte (Sanjuán-Pinilla y Moreno-Sarmiento, 2010). Sin embargo, todavía es necesario investigar qué nuevas alternativas se están desarrollando para combatir los hongos fitopatógenos en forestales.

METODOLOGÍA:

***Área(s) de estudio**

La investigación se ha realizado en fincas del municipio de Santa Rosa de Cabal, pertenecientes a los corregimientos Potrerros, Samaria, San Juan y en el Campus de la Universidad Santa Rosa de Cabal (UNISARC), cuyas especies forestales evaluadas son Roble Colombiano (*Quercus humboldtii*), Nogal Cafetero (*Cordia alliodora*) y Cedro Negro (*Juglans neotropica*) que se encuentran en sistemas agroforestales. Los sitios de muestreo se encuentran en un rango altitudinal de 1600-2250 msnm.

***Toma de muestras**

Se seleccionan individuos aleatoriamente de cada especie que presenten hojas con síntomas iniciales, recolectando para cada síntoma dos hojas (repeticiones) y depositándolos en bolsas ziploc con el fin de evitar contaminación cruzada y transportarlos hasta el laboratorio.

***Análisis biológico y molecular de las muestras**

-Aislamiento e identificación microbiológica de hongos

Las muestras obtenidas se procesan de dos formas para obtener los agentes fitopatógenos causantes de las enfermedades:

- **Siembra en medios de cultivo.** Se toma una pequeña fracción de hoja que contenga el síntoma y se realiza desinfección de la misma según el protocolo de Agrios (1995): Hipoclorito de Sodio al 1% durante un minuto, alcohol al 1% durante un minuto y agua destilada esteril durante un minuto. Este material desinfectado se siembra en medios de cultivo como Rosa Bengala (con Cloranfenicol) y PDA (Papa Dextrose Agar). La revisión de los cultivos se realiza a los siete días de sembrado.
- **Cámaras húmedas.** Se toma la hoja con el síntoma y se deposita en bolsas plásticas que contengan algodón quirúrgico humedecido con agua destilada estéril (Agrios, 1995).

Para el montaje de los hongos se hace un breve raspado con cuchillas estériles, se disponen en placas portaobjetos con una gota de Azul de Lactofenol y se visualizan en el microscopio. Allí se determinan las estructuras que poseen (como hifas y esporas) y mediante el libro de Castaño-Zapata (2015) se realiza la clasificación taxonómica de los hongos.

-Pruebas de patogenicidad

Los hongos aislados e identificados son evaluados para confirmar si son los causantes de la enfermedad. Para ello, los aislados deben estar puros y se deben someter a un crecimiento en medio de cultivo líquido que se compone de Agar peptonado y Ácido Láctico al 44% durante un día, para luego evaluar su concentración de esporas y pureza.

Consecutivamente se recolectan hojas sanas que no presenten ningún síntoma y se desinfectan para eliminar otros contaminantes con agua destilada estéril, tween al 20%, hipoclorito de sodio al 1% y nuevamente tween al 20% durante periodos de 10 minutos, excepto el hipoclorito que se implementa por dos minutos. Para cada hongo se utiliza 3 repeticiones, que son colocadas en cámaras húmedas (compuestas por bandejas de icopor, algodón quirúrgico humedecido con agua destilada estéril y película plástica transparente).

La solución que contiene el hongo es inoculado con micropipeta de 10 o 15 µl sobre cada hoja.

-Identificación molecular de hongos

Los hongos más relevantes y que han demostrado ser patógenos son procesados para su identificación mediante extracción de ADN, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), electroforesis y secuenciación.

- **Extracción de ADN fúngico.** Se realiza mediante el protocolo de Hafner *et al.*, 1995, modificado por Becerra y Garnet, (2011); Gómez y Betancourt, (2012).

- *Tomar micelio del hongo, agregar 200 µl de SDS al 1% (Sodio Dodecil Sulfato) y triturar.
- *Agregar 200 µl de Fenol.
- *Agregar 200 µl de Cloroformo.
- *Mezclar bien y centrifugar a máxima velocidad (13000 a 14000 rpm) por 15 minutos.
- *Recoger sobrenadante.
- *Re-extraer con un volumen igual de cloroformo.
- *Mezclar nuevamente y centrifugar a máxima velocidad (13000 a 14000 rpm) por 15 minutos.
- *Recoger nuevamente el sobrenadante.
- *Precipitar los ácidos nucleicos totales con 50 µl Isopropanol.
- *Centrifugar a máxima velocidad (13000 a 14000 rpm) durante 10 minutos.
- *Retirar el sobrenadante y secar el precipitado por 5 minutos a temperatura ambiente.
- *Resuspender con agua destilada estéril.

- **PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y Electroforesis.** Esta técnica permite la amplificación de la zona de interés en el ADN genómico. Para ello se utiliza 50µl que contiene 1X (Tampón de reacción), 400 nM de cada primer, 100 µM de cada dNTPs, 1,0 mM de MgCl₂ y 0,5 unidades de enzima Taq polimerasa (Ref. Biotools B&M, 10042). Las zonas que se amplifican corresponden a las subunidades ribosomales 18S rDNA y 25S rDNA que también incluyen las regiones no conservadas (Internal Transcribed Spacers- ITS) y el ribosoma 5.8S rDNA, las cuales facilitan la identificación a nivel de género y especie. Los primers que se utilizan para los hongos son ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White *et al.*, 1990).

Los productos amplificados son corridos en gel de agarosa y extraídos utilizando el protocolo de Quiagen, Ref, QIAquick@Spin Handbook, 2008.

- **Secuenciación.** Los productos eluidos se envían a MACROGEN Korea para su procesamiento y entrega de los cromatogramas, y estos se limpian de indeterminaciones con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 1997, obteniendo así las secuencias que serán comparadas utilizando BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) para determinar las similitudes en el GenBank. El GenBank es el que permite la clasificación definitiva de los géneros y especies de hongos.

RESULTADOS: Se ha procesado alrededor de 116 muestras de Roble Colombiano, Nogal Cafetero y Cedro Negro, cuyo aislamiento e identificación de cepas ha determinado la presencia de 3 hongos pertenecientes a los géneros *Pestalotia*, *Colletotrichum* y *Alternaria*.

***Pestalotia* sp.**

Síntomas: En Roble Colombiano (a) se observó manchas necróticas irregulares. De igual manera, en Nogal Cafetero (b) se evidenció manchas irregulares de coloración café las cuales iniciaban desde las nervaduras hacia la parte exterior.

En medio de cultivo, se presentó micelio algodonoso de altura media en forma de “roseta” de coloración blanquecina. A nivel microscópico fue evidente acérvulos inmersos en el tejido no setosos, esporas, didimosporas con tres apéndices en uno de sus polos (Castaño-Zapata, 2015).



a. Síntomas de *Pestalotia* en Roble

b. Síntomas de *Pestalotia* en Nogal Cafetero

***Colletotrichum* sp**

Síntomas: En Nogal Cafetero se presentó manchas foliares de coloración pardo oscuro a negro, de forma irregular.

En medio de cultivo se detectó crecimiento rápido y algodonoso de coloración grisácea de altura media. A nivel microscópico se detectó acérvulos setosos en forma de disco, esporas unicelulares o amerosporas y las setas con su típica coloración oscura (Castaño-Zapata, 2015).



Síntomas de *Colletotrichum* en Nogal Cafetero

***Alternaria* sp**

Síntomas: En Cedro Negro se observó manchas color café con aro clorótico por el haz de la hoja.

En medio de cultivo se observó el crecimiento superficial de textura lanosa y coloración café oscura. A nivel microscópico se observó esporas muriformes o también denominadas fragmosporas de coloración oscura. Estas esporas están formadas en conidióforos basipétados (Castaño-Zapata, 2015).



Sintomas de *Alternaria* en Cedro Negro

RESULTADOS ESPERADOS: Se realizarán pruebas de patogenicidad para corroborar que las especies anteriormente mencionadas afectan a los tres forestales nativos. Además se hará su posterior caracterización molecular para confirmar su clasificación taxonómica.

CONCLUSIONES:

*La mayoría de especies forestales nativas se encuentran amenazadas, por lo que promover su uso sostenible es una alternativa para generar ingresos económicos sin afectar gravemente a sus poblaciones, Además esto está regulado en planes de desarrollo y políticas nacionales ambientales.

*El estudio de las enfermedades presentes en especies forestales nativas es importante para realizar planes de manejo que permitan controlar los agentes causales como hongos fitopatógenos. También es necesario investigar otras opciones que a largo plazo sean rentables para productores de madera proveniente de estos forestales.

IMPACTOS:

***Social:** El conocimiento generado de esta investigación servirá como base a investigadores y a la comunidad en general que está interesada en las enfermedades de especies forestales nativas, por lo que se podrán derivar diversos trabajos que aporten al estudio de sus patologías causadas por hongos.

***Económico:** Se podrá promover el uso racional de este tipo de especies para que aporte significativamente a la economía de la región y del país, por lo que estas especies poseen diversas cualidades que las hacen candidatas para reforestación y producción de materias primas.

***Ambiental:** Se podrán realizar planes de manejo y conservación de este tipo de especies para que sus poblaciones no sigan disminuyendo.

BIBLIOGRAFÍA:

Agrios, G. (1995). Fitopatología. *Editorial Limusa S. A.* 838 p.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology.* 215(3): 403-410

- Bare, M. C. y Ashton, M. S. (2015). Growth of native tree species planted in montane reforestation projects in the Colombian and Ecuadorian Andes differs among site and species. *New Forests*. 47(3), 333-355
- Cárdenas, D. y Salinas, N. (2006). *Libro rojo de plantas de Colombia. Especies maderables amenazadas parte I*. Bogotá, Colombia. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI.
- Castaño-Zapata, J. (2015). *Principios Básicos de Hongos Fitopatógenos*. Editorial Universidad de Caldas. 362 p
- Gómez, E. A., Ríos, L. A. y Peña, J. D. (2012). Madera, un potencial material lignocelulósico para la producción de biocombustibles en Colombia. *Información Tecnológica*. 23(6), 73-86
- Gómez-Correa, J. C., Buriticá-Céspedes, P. y Salazar-Yepes, M. (2012). Revisión de los uredinales colectados sobre *Cordia* (Boraginaceae) en Colombia. *Revista Mexicana de Micología*. 36, 41-47
- Hafner, G. J., Harding, R. M. y Dale, J. L. (1995). Movement and transmission of banana bunchy top virus DNA component one in bananas. *Journal of Genetic Virology*. 76, 2279-2285
- Jactel, H., Nicoll, B. C., Branco, M., Gonzalez-Olabarria, J. R., Grodzki, W., Långström, B., Moreira, F., Netherer, S., Orazio, C., Piou, D., Santos, H., Schelhaas, M. J., Tojic, K. y Vodde, F. (2009). The influences of forest stand management on biotic and abiotic risks of damage. *Annals of Forest Science*. 66, 18 p
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissman, S. y Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*. 66, 513-545
- López, R. (2008). Productos forestales no maderables: importancia e impacto de su aprovechamiento. *Revista Colombia Forestal*. 11, 215-231
- Ministerio del Medio Ambiente, Ministerio de Comercio Exterior, Ministerio de Desarrollo Económico, Departamento Nacional de Planeación y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2000). *Plan Nacional de Desarrollo Forestal*. Bogotá, Colombia. 71p
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2012). *Política nacional para la gestión integral de la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos*. Bogotá D.C. 134 p.
- Monroy-Castro, L. y Lizarazo-Forero, L. (2010). Identificación de hongos fitopatógenos asociados al Roble (*Quercus humboldtii* Bonpl.), en los municipios de Encino (Santander) Arcabuco, y Tipacoque (Boyacá). *Colombia Forestal*. 13(2), 347-356
- Montagnini, F. (2004). *Plantaciones forestales con especies nativas. Una alternativa para la producción de madera y la provisión de servicios ambientales*. Recursos Naturales y Ambiente. 43, 28-35

- Ospina-Penagos, C. M., Hernández-Restrepo, R. J., Sánchez, F. A., Rincón, E. A., Ramírez, C. A., Godoy, J. A., y Medina, J. A. (2010). *Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana: El Nogal Cafetero (Cordia alliodora)*. Chinchiná, Colombia. CENICAFÉ.
- Ospina-Penagos, C. M., Hernández-Restrepo, R. J., Aristizabal-Valencia, F. A., Patiño-Castaño, J. N. y Salazar-Castaño, J. W. (2003). *El Cedro Negro: una especie promisorio de la zona cafetera*. Chinchiná, Colombia. CENICAFÉ.N
- Sanjuán-Pinilla, J. y Moreno-Sarmiento, N. (2010). Aplicación de insumos biológicos: una oportunidad para la agricultura sostenible y amigable con el medio ambiente. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 12(1), 4-7
- Pardo-Cardona, V. M. (1998). Uredinales (royas) de Cordia L. (Boraginaceae) en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 51, 277-283
- Piotto, D., Craven, D., Montagnini, F. y Alice, F. (2010). Silvicultural and economic aspects of pure and mixed native trees species plantations on degraded pasturelands in humid Costa Rica. *New Forests*. 39, 369-385
- PROEXPORT. (2012). *Sector forestal en Colombia*.
- PROFOR. (2015). *Colombia: Potencial de Reforestación Comercial*. Banco Mundial.
- Rodríguez, K. J. y Maldonado, J. H. (2008). Importancia de los productos forestales maderables y no maderables en los hogares de Puerto Nariño (Amazonas, Colombia). *Cuadernos de Desarrollo Rural*. 6(62), 31-52
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. (pp. 315-322) En: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J. (eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York, USA.
- Wingfield, M. J., Slippers, B., Roux, J. Wingfield, B. D. (2001). Worldwide movement of exotic forest fungi, especially in the Tropics and the Southern Hemisphere. *BioScience*. 51(2), 134-140