

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
IASA I**

**“CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA
ANTRACNOSIS DEL TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betacea*) Y
CHOCHO (*Lupinus mutabilis*)”**

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

**PINTO TAFUR LILIANA ELIZABETH
TIAGUARO HERRERA CARLA ALEJANDRA**

**SANGOLQUÍ – ECUADOR
2012**

RESUMEN

En Ecuador los cultivos de tomate de árbol y chocho presentan elevadas pérdidas en su producción a causa de la antracnosis ocasionada por varias especies del género *Colletotrichum*. Por esta razón, en este estudio se identificaron las especies de *Colletotrichum* de los dos cultivos, provenientes de Imbabura, Pichincha y Tungurahua, mediante características morfológicas, patogénicas y moleculares.

Colletotrichum spp se determinó mediante el análisis del color y tamaño de la colonia y el tamaño y forma de la conidia. Los resultados obtenidos para el color de la colonia fueron verde oliva para chocho y salmón- anaranjado para tomate de árbol, mientras que la forma de la conidia en los dos cultivos fue fusiforme con un tamaño de 15.0- 16.3 x 5.7- 6.9um en chocho y 14.07- 16.03 x 6.1- 6.9um en tomate de árbol característicos de *C. acutatum*. La identificación molecular de las especies de *Colletotrichum* se realizó mediante una prueba de diagnóstico con cebadores específicos de *C. gloeosporioides* (CgInt) y de *C. acutatum* (CaInt2), en combinación con el iniciador universal ITS4. De acuerdo con los resultados obtenidos, se determinó que *C. acutatum* es el agente causal de la antracnosis en tomate de árbol y chocho. La amplificación de secuencias de las regiones ITS del ADN ribosomal por medio de PCR, se utilizó para constatar la filogenia de *C. acutatum*. Para la prueba de patogenicidad se inoculó el hongo, aislado de los dos cultivos, en tallos de tomate de árbol y chocho, para evaluar la infección de cada aislamiento sobre el hospedero, a fin de detectar infección cruzada. La prueba de patogenicidad resultó positiva para chocho y tomate de árbol mostrando rango de hospederos cruzados entre estos cultivos.

Palabras clave: *Colletotrichum spp*, *Colletotrichum acutatum*, chocho, tomate de árbol, antracnosis.

SUMMARY

In Ecuador, tree tomato and lupin crops are likely to suffer considerable losses from anthracnose caused by several *Colletotrichum* species. For this reason, this study identified the species of *Colletotrichum* of the two crops, producers from Imbabura, Pichincha and Tungurahua, by their morphological, pathogenic and molecular.

Colletotrichum spp was determined by analyzing the color and size of the colony and the size and shape of conidia. The results for the color of the colony were olive green and salmon-orange lupino for tree tomato, while the shape of the conidia in the two cultures was fusiform with a size of 15.0-16.3 x 5.7-6.9um and lupino 16.0 x 7.14-6.1-6.9um tree tomato characteristic of *C. acutatum* Molecular identification of *Colletotrichum* species was performed by a diagnostic test with primers specific for *C. gloeosporioides* (CgInt) and *C. acutatum* (CaInt2) in combination with the ITS4 universal primer. The results indicate that *C. acutatum* is the infectious agent in tree tomato and lupin. The amplification of sequences of ribosomal DNA ITS regions by PCR, was used to confirm the phylogeny of *C. acutatum*. For the pathogenicity test was inoculated fungus, isolated from the two crops, tree tomato stems and pussy, to evaluate the infection of each strain on the host, in order to detect cross-infection. The pathogenicity test was positive for tree tomato and lupino showing cross host range among these crops.

Key words: *Colletotrichum spp*, *Colletotrichum acutatum*, tree tomato, lupin, anthracnose

CERTIFICACIÓN

Ing. MSc César Falconí, PhD (c)

Ing. MSc Abraham Oleas.

Certifican:

Que el trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ANTRACNOSIS DEL TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betacea*) Y CHOCHO (*Lupinus mutabilis*)”, realizado por las señoritas Liliana Elizabeth Pinto Tafur y Carla Alejandra Tiaguaro Herrera, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a la señoritas Liliana Elizabeth Pinto Tafur y Carla Alejandra Tiaguaro Herrera que lo entregue a la Ing. Patricia Falconí en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 19 de Enero, 2012

Ing. MSc César Falconí, PhD (c)

DIRECTOR

Ing. MSc Abraham Oleas.

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

**LILIANA ELIZABETH PINTO TAFUR Y CARLA ALEJANDRA
TIAGUARO HERRERA**

Declaramos que:

El proyecto de grado denominado “CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ANTRACNOSIS DEL TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betacea*) Y CHOCHO (*Lupinus mutabilis*)”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan en las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de nuestra autoría.

En virtud de esta declaración, nos responsabilizamos del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 19 de Enero, 2012

Liliana Elizabeth Pinto Tafur

Carla Alejandra Tiaguaro Herrera

AUTORIZACIÓN

Nosotros, Liliana Elizabeth Pinto Tafur y Carla Alejandra Tiaguaro Herrera

Autorizamos a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ANTRACNOSIS DEL TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betacea*) Y CHOCHO (*Lupinus mutabilis*)”, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 19 de Enero, 2012

Liliana Elizabeth Pinto Tafur

Carla Alejandra Tiaguaro Herrera

DEDICATORIA

A mis amados padres Oswaldo Pinto y María Soledad Tafur, por ser el pilar fundamental de mi vida, por guiarme con sabiduría y por ser el motivo principal por el que luché cada día para cumplir mis metas.

A mí querido hermano Víctor, por ser mi ejemplo y mi amigo.

Liliana Elizabeth Pinto Tafur

AGRADECIMIENTO

A Dios por la vida, por las oportunidades que ha puesto en mi camino, por mi familia y por mis amigos.

A mis tíos, primos y demás familiares que están presentes en todas las etapas de mi vida y que con cariño me apoyan en el cumplimiento de mis metas.

A los ingenieros César Falconí y Abraham Oleas por haberme dado la oportunidad de realizar esta investigación asesorándome para cumplir exitosamente con la ejecución de la misma.

A mi compañera de tesis, mejor amiga y hermana Carla por haber estado conmigo no solo en la realización del proyecto sino en todos los momentos importantes de mi vida, ayudándome cuando lo necesitaba.

A mis queridos amigos Alberto, Danilo, Galo, Massiel, Isabel, Daniel y Andrea por su amistad y apoyo durante los años de carrera universitaria.

A la Escuela Politécnica del Ejército ESPE, su Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA I y su personal Docente, por los valiosos conocimientos impartidos.

Liliana Elizabeth Pinto Tafur

DEDICATORIA

A mi madre Martha Herrera que por sus enseñanzas a lo largo de mi vida se ha convertido en un ejemplo de admiración y respeto. Por enseñarme a que siempre habrá obstáculos en el camino pero lo importante es sobrellevarlos y aprender de ellos y nunca conformarme sino lograr mis sueños con paciencia y dedicación.

A mi padre Luis Tiaguaro por su apoyo incondicional y por siempre confiar en mí.

A mi querido hijo Esteban Nicolás que fue mi inspiración estos últimos meses y me dio fuerza para continuar cada día.

Carla Alejandra Tiaguaro Herrera

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser su hija y concederme las facultades de levantarme cada día.

A mis padres Martha Herrera y Luis Tiaguaro por darme la vida y apoyarme confiando en mí. Que Dios les conceda mucha salud para seguir compartiendo logros.

A mis hermanos Marco Tiaguaro que con su intachable actitud y paciencia ha sido un ejemplo a seguir y pilar fundamental en mi formación y Richard Sánchez por su apoyo, ayuda y cariño. Sin su amor no sería la persona que soy.

A una persona muy especial que más que una amiga es como mi hermana Liliana Pinto por estar siempre conmigo y nunca dejar que desmaye sin tu laboriosa comprensión, ayuda y dedicación este trabajo no sería el mismo, espero siempre contar contigo el resto de mi vida.

A mis tías Mercedes, Elizabeth y demás familia que con sus consejos y ayuda me han ido guiando en el transcurso de mi vida.

A los Ing. Cesar Falconí y Abraham Oleas, por su ayuda incondicional y por compartirnos sus valiosos conocimientos que nos sirvió para culminar con el desarrollo de esta investigación.

A mis queridos y siempre recordados amigos Alberto, Galo, Danilo, Daniel, Massiel, Alejandra e Isabel que de una u otra manera siempre han estado conmigo y espero siempre contar con ustedes.

A la Escuela Politécnica del Ejército ESPE a su Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA I, y a todo su personal.

Carla Alejandra Tiaguaro Herrera

ÍNDICE

CONTENIDO	Pag
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVO GENERAL	2
1.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. CULTIVO DE TOMATE DE ARBOL.....	4
2.1.1. Descripción del Cultivo.....	4
2.1.2. Importancia del Cultivo en el Ecuador.....	5
2.1.3. Antracnosis en el Tomate de Árbol.....	6
2.2. CULTIVO DE TOMATE DE CHOCHO.....	8
2.2.1. Descripción del Cultivo.....	8
2.2.2. Importancia del Cultivo en el Ecuador	9
2.2.3. Antracnosis en el Chocho.....	10
2.2.3.1. Síntomas	10
2.2.3.2. Diseminación	11
2.2.3.3. Supervivencia	11
2.3. RESISTENCIA EN PLANTAS	12
2.3.1. Resistencia de Plantas contra Enfermedades.....	12
2.3.1.1 Mecanismos de defensa	12
2.3.1.2. Genes de resistencia.....	13
2.3.1.3. Variación alélica entre genes R	14
2.4. RESISTENCIA DEL CHOCHO A LA ANTRACNOSIS	14
2.5. RESISTENCIA DEL TOMATE DE ÁRBOL A LA ANTRACNOSIS....	15
2.6. MÉTODOS DE INOCULACIÓN DE <i>Colletotrichum spp</i>	16
2.7. ROTACIÓN DE CULTIVOS	17
2.7.1. Importancia de la Rotación de Cultivos.....	17
2.7.2. Amplio y Estrecho Rango de Hospederos	19
2.8. HERRAMIENTAS MOLECULARES	20
2.8.1. Métodos de Extracción	20
2.8.2. Técnica de PCR	22
2.8.3. Métodos para Visualizar la PCR	26
2.8.3.1. Métodos para geles de agarosa	27

2.8.3.2. Cargando el gel	28
2.8.3.3. Tinción del gel	28
2.9. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Colletotrichum</i> spp.	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN	31
3.1.1. Ubicación Política	31
3.1.2. Ubicación Geográfica	31
3.1.3. Ubicación Ecológica.....	32
3.2. MATERIALES	33
3.2.1. Materiales para la Fase de Laboratorio.....	33
3.2.2. Materiales para la Fase de Invernadero	34
3.2.3. Materiales de Oficina.....	35
3.3. MÉTODOS	35
3.3.1. Fase Experimental de Laboratorio.....	35
3.3.1.1. Caracterización morfológica de poblaciones de <i>Colletotrichum</i> spp.	35
3.3.1.2. Caracterización molecular de poblaciones de <i>Colletotrichum</i> spp.....	38
3.3.2. Fase Experimental de Invernadero	44
3.3.2.1. Siembra de semillas de chocho y tomate de árbol.....	44
3.3.2.2. Inoculación en las plantas de chocho y tomate de árbol...	45
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1. DIÁMETRO Y ÁREA DE LA COLONIA DE AISLAMIENTO DE CHOCHO	47
4.2. DIÁMETRO Y ÁREA DE LA COLONIA DE AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL.....	48
4.3. FORMA DE LA COLONIA DE LOS AISLAMIENTOS DE CHOCHO	49
4.4. FORMA DE LA COLONIA DE LOS AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL	50
4.5. FORMA DEL ANILLO CONCÉNTRICO DEL MICELIO DE LOS AISLAMIENTOS DE CHOCHO	51

4.6. FORMA DEL ANILLO CONCÉNTRICO DEL MICELIO DE LOS AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL	51
4.7. COLOR DE LA COLONIA DE LOS AISLAMIENTOS DE CHOCHO	52
4.8. COLOR DE LA COLONIA EN LOS AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL	53
4.9. TAMAÑO DE LAS CONIDIAS DE LOS AISLAMIENTOS DE CHOCHO	55
4.10.TAMAÑO DE LA CONIDIA DE LOS AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL.....	56
4.11.CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE <i>Colletotrichum</i> spp, MEDIANTE PRIMERS ESPECÍFICOS DE LA ESPECIE CaInt2 y CgInt EN COMBINACIÓN CON ITS4	59
4.12.CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE <i>Colletotrichum acutatum</i> , MEDIANTE SECUENCIAS ITS-PCR	60
4.13.INCIDENCIA DE LA ANTRACNOSIS EN EL CULTIVO DE CHOCHO	63
4.14.SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN EL CULTIVO DE CHOCHO	65
4.15.INCIDENCIA DE LA ANTRACNOSIS EN EL CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL.....	68
4.16.SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN EL CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL.....	70
V. CONCLUSIONES	74
VI. RECOMENDACIONES	76
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	77
VIII ANEXOS.....	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No 1. Posición geográfica de las localidades donde se tomaron muestras con síntomas característicos de antracnosis en tomate de árbol y chocho.....	36
Cuadro No 2. Análisis de varianza para el diámetro y área de la colonia de 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis en el cultivo de chocho (<i>L. mutabilis</i>), IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011.....	47
Cuadro No 3. Variabilidad en el tamaño de la colonia en 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis en el chocho (<i>L. mutabilis</i>).....	48
Cuadro No 4. Análisis de varianza para el diámetro y área de la colonia de 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis del tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>). IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011.....	48
Cuadro No 5. Variabilidad en el tamaño de la colonia en 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis en tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>).....	49
Cuadro No 6. Análisis de varianza para el largo y ancho de la conidia de 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis del chocho (<i>L. mutabilis</i>), IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011.....	56
Cuadro No 7. Variabilidad en el tamaño de la conidia en 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis en chocho (<i>L. mutabilis</i>).....	56
Cuadro No 8. Análisis de varianza para el largo y ancho de la conidia de 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causante de la antracnosis del tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>), IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011.....	57
Cuadro No 9. Variabilidad en el tamaño de la conidia en 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis en tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>).....	57

Cuadro No 10. Análisis de varianza para la incidencia de la antracnosis del chocho (<i>L. mutabilis</i>), luego de 25 días de la inoculación, IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011.....	63
Cuadro No 11. Respuesta de 3 variedades de chocho (<i>L. mutabilis</i>) sobre la incidencia de la antracnosis (<i>C. acutatum</i>), luego de 25 días de la inoculación.....	64
Cuadro No 12. Efecto de 10 aislamientos de <i>C. acutatum</i> sobre la incidencia de la antracnosis del chocho (<i>L. mutabilis</i>), luego de 25 días de la inoculación.....	64
Cuadro No 13. Análisis de varianza para la severidad de la antracnosis del chocho (<i>L. mutabilis</i>), luego de 25 días de la inoculación, IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011.....	65
Cuadro No 14. Respuesta de 3 variedades de chocho (<i>L. mutabilis</i>) sobre la severidad de la antracnosis, luego de 25 días de la inoculación.....	66
Cuadro No 15. Efecto de 10 aislamientos de <i>C. acutatum</i> , sobre la severidad de la antracnosis luego de 25 días de la inoculación en el chocho (<i>L. mutabilis</i>).....	66
Cuadro No 16. Análisis de varianza para la incidencia de la antracnosis del tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>), luego de 25 días de la inoculación, IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011.....	68
Cuadro No 17. Respuesta de 2 variedades de tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>), sobre la incidencia de la antracnosis, luego de 25 días de la inoculación.....	69
Cuadro No 18. Respuesta de 10 aislamientos de <i>C. acutatum</i> sobre el desarrollo de antracnosis en el tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>), luego de 25 días de la inoculación.....	69
Cuadro No 19. Análisis de varianza para la severidad de la antracnosis en el cultivo de tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>), luego de 25 días de la inoculación. IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011.....	70

Cuadro No 20. Respuesta de 2 variedades de tomate de árbol (*S. betaceum*), a la severidad de la antracnosis, luego de 25 días de la inoculación.....**71**

Cuadro No 21. Respuesta de 10 aislamientos de *C. acutatum* sobre el desarrollo de antracnosis en el tomate de árbol (*S. betaceum*), luego de 25 días de la inoculación.**71**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos meteorológicos de la Hacienda el Prado.....	32
Tabla2. Secuencias de iniciadores o primers a usarse en la caracterización molecular de <i>Colletotrichum</i> spp.....	40
Tabla 3. Condiciones estándar para un PCR (cálculos para 50ul en cada tubo).....	41
Tabla 4. Condiciones estándar para un PCR (cálculos para 50ul en cada tubo).....	41
Tabla 5. Espaciador transcrito interno 1 y 2 secuencias de aislados de <i>Colletotrichum</i> utilizados en este estudio.....	43

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico No 1 Análisis comparativo de la forma de la colonia para 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis del chocho.....	50
Gráfico No 2 Análisis comparativo de la forma de la colonia para 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis del tomate de árbol.....	50
Gráfico No 3 Análisis comparativo del anillo concéntrico del micelio de 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis del chocho.....	51
Gráfico No 4 Análisis comparativo del anillo concéntrico del micelio de 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis del tomate de árbol.....	52
Gráfico No 5 Análisis comparativo del color de la colonia de 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis del chocho.....	53
Gráfico No 6 Análisis comparativo del color de la colonia de 5 aislamientos de <i>C. acutatum</i> causa de la antracnosis del tomate de árbol.....	54
Gráfico 7. Dendograma de 10 secuencias ITS- PCR de <i>C. acutatum</i> (5 de chocho y 5 de tomate de árbol) comparadas con 32 secuencias ITS- PCR de <i>C. acutatum</i> tomados de Falconí C.E. (en prensa).....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de tomate de árbol severamente afectadas por <i>Colletotrichum acutatum</i>	6
Figura 2. Planta de chocho severamente afectadas por <i>Colletotrichum acutatum</i> . Destaca la típica curvatura de brotes de la enfermedad.....	11
Figura 3. Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción. Comúnmente se utilizan 35 ciclos para amplificar el fragmento que se requiere.....	26
Figura 4. Localización geográfica de la Hacienda el Prado (IASA).....	32
Figura 5. Prueba de diagnóstico de 10 aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp (5 de chocho y 5 de tomate de árbol) mediante primers específicos de la especie CaInt2 y CgInt en combinación con ITS4. Marcador molecular 100bp.....	59
Figura 6. Colonia de <i>Colletotrichum</i> spp extraída de chocho.....	87
Figura 7. Colonia de <i>Colletotrichum</i> spp extraída de tomate de árbol.....	87
Figura 8. Visualización de esporas de <i>Colletotrichum</i> spp en estereomicroscopio para siembra de cultivos monospóricos.....	88
Figura 9. Extracción de esporas de <i>Colletotrichum</i> spp para siembra de cultivos monospóricos.....	88
Figura 10. Cultivos monospóricos de <i>Colletotrichum</i> aislado chocho.....	89
Figura 11. Cultivos monospóricos de <i>Colletotrichum</i> aislado de tomate de árbol.....	89

Figura 12. Caracterización morfológica de la colonia de <i>Colletotrichum</i> aislado de chocho.....	90
Figura 13. Caracterización morfológica de la colonia de <i>Colletotrichum</i> aislado de tomate de árbol.....	90
Figura 14. Tamaño y forma de la conidia de <i>Colletotrichum</i> aislado de chocho.....	91
Figura 15. Tamaño y forma de la conidia de <i>Colletotrichum</i> aislado de tomate de árbol.....	91
Figura 16. Extracción de ADN de <i>Colletotrichum</i> aislado de chocho y tomate de árbol.....	92
Figura 17. ADN de <i>Colletotrichum</i> aislado de chocho (parte superior) y tomate de árbol (parte inferior).....	92
Figura 18. Producto ITS-PCR de <i>Colletotrichum</i> aislado de chocho (parte izquierda) y tomate de árbol (parte derecha).....	93
Figura 19. Aclimatación de plantas de chocho.....	93
Figura 20. Aclimatación de plantas de tomate de árbol.....	94
Figura 21. Inoculación en plantas de chocho.....	94
Figura 22. Inoculación en plantas de tomate de árbol.....	95

I. INTRODUCCIÓN

La antracnosis del tomate de árbol causada por el hongo *Colletotrichum* spp, es la enfermedad más importante en la producción frutícola a nivel mundial y nacional, debido a la severidad de los daños que ocasiona, a la magnitud de las pérdidas que genera tanto en producción, en la calidad de la cosecha y a su control difícil (Alarcón y Chavarriaga, 2008).

Al igual que el tomate, el chocho es susceptible a enfermedades. La antracnosis causada por *Colletotrichum* spp llega a causar pérdidas de hasta del 100%. Este patógeno habita en la semilla, misma que al convertirse en planta, afecta en la producción y calidad del grano (E- CIENCIA, 2009).

En la serranía ecuatoriana es común observar plantaciones conjuntas de chocho y tomate de árbol, afectadas por la antracnosis. Recientes estudios han demostrado que aislamientos de *C. acutatum* obtenidos de plantas de chocho fueron patogénicos al inocular a frutos tomate de árbol y viceversa (Falconí y van Heusden, 2012). Esta investigación confirmó el grado de infección de los hospederos cuando se inoculó aislamientos de plantas de chocho en plantas de tomate de árbol y de frutos de tomate de árbol en plantas de los dos hospederos.

Además se evaluó la resistencia y tolerancia a la antracnosis de genotipos de chocho y tomate de árbol, cultivos nativos importantes en la agricultura ecuatoriana obteniendo genotipos menos susceptibles al ataque de la antracnosis.

En Ecuador, se carece de información clara referente a la o las especies de *Colletotrichum* spp, y la taxonomía de estos patógenos causantes de la antracnosis en lupino y tomate de árbol. Un reciente estudio usando secuencias de la región interna ribosomal - cadena de reacción de polimerasa (ITS-PCR) y aspectos patológicos, caracterizó al agente causal de la antracnosis como *C. acutatum* (Falconí y van Heusden, 2012). Las metodologías usadas en este estudio para la identificación morfológica y molecular de *Colletotrichum acutatum* y *gloeosporioides* se basaron en estos hallazgos recientes.

La investigación se llevó a cabo en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, Hacienda el Prado, en los laboratorios e invernaderos del área de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias – I.A.S.A, en un periodo de 8 meses de estudio en campo y laboratorio, durante el cual se evaluaron en la fase experimental de laboratorio el aspecto morfológico y molecular de *Colletotrichum* spp y en la fase de invernadero la patogenicidad del hongo tanto en chocho como en tomate de árbol.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar patológica y molecularmente poblaciones de *Colletotrichum* spp, causa de la antracnosis del chocho y tomate de árbol en diversas localidades de la serranía ecuatoriana.

1.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar morfológicamente poblaciones de *Colletotrichum* spp.
- Caracterizar molecularmente poblaciones de *Colletotrichum* spp por medio de la amplificación del espaciador interno transcrito, (ITS) del rARN.
- Determinar la distancia genética entre los aislamientos de *Colletotrichum* spp y graficar sus relaciones fenéticas.
- Determinar el rango de hospederos de las cepas recolectadas de *Colletotrichum* mediante inoculaciones en plantas de tomate de árbol y plantas de chocho, en invernadero.
- Difundir la tecnología generada a través de presentaciones con diapositivas y charlas generales.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CULTIVO DE TOMATE DE ARBOL

2.1.1. Descripción del Cultivo

Según Cadena, Idrovo y MAG/IICA, citados por Ramírez (2008), el tomate de árbol es una planta perteneciente a la familia de las Solanáceas. El nombre científico del tomate de árbol se fijó definitivamente como *Solanum betaceum* Cav; en el año de 1995, en sustitución del anterior *Cyphomandra betacea* Sendt. Está clasificada como semiácida originaria de América, específicamente Perú, Ecuador y Colombia, en donde se la conoce por varios nombres comunes.

Planta arbustiva con tallos semileñosos, de follaje grande, que alcanza una altura de 2 a 3m. Las hojas son cordiformes (forma de corazón), carnosas, levemente pubescentes y muy grandes. Las flores de color rosa y lavanda, agrupadas en racimos terminales, las cuales florecen de manera escalonada. Los frutos son solitarios ó se encuentran agrupados, de colores variables, del amarillo al rojo, de forma ovoidal con ápices puntiagudos, contienen muchas semillas pequeñas, en cantidades de 120 a 150 (Calvo, 2009).

Según Cadena, Idrovo y MAG/IICA, citados por Ramírez (2008), en Ecuador se producen tres variedades reconocidas de tomate de árbol, aunque comercialmente no se las diferencia. Estas son: *tomate común*: de forma alargada,

color morado y anaranjado; *tomate redondo*: de color anaranjado rojizo y *tomate mora*: de forma oblonga y de color morado.

2.1.2. Importancia del Cultivo en el Ecuador

En el Ecuador se ha desarrollado la explotación de frutales andinos, de ellos sobresale el tomate de árbol (*S. betaceum*). El crecimiento de la demanda interna desde hace unos 15 años, ha motivado para que el cultivo se extienda comercialmente a otras zonas de producción. El libre comercio en el Pacto Andino y en general a nivel mundial, así como la expectativa en mercados de Europa han abierto algunas perspectivas de crecimiento, desarrollo y exportación de frutos andinos, principalmente de tomate de árbol, mismo que por su rentabilidad en pequeñas áreas (0.5- 1ha), ha dado oportunidad de sustento a muchas familias ecuatorianas. Un buen porcentaje de tomate de árbol tiene como destino los países vecinos, sobre todo Colombia, aunque últimamente el flujo de tomate de árbol más bien se desplaza desde Colombia al Ecuador (Pilco, 2009).

El cultivo comercial de esta especie se inicia en el país en 1970, desde ahí, ha demostrado un incremento tanto en su área cosechada, como en su producción, es así que la superficie cultivada para 1991 fue de 1.020 ha, mientras que para 2004 fue de 2.287 ha así también, la producción nacional en 1991 fue de 10.865Tn, en comparación con la producción nacional para el año de 2004, que fue de 21.163Tn, lo que significa que en el período desde 1991 al 2004, los datos de superficie cosechada y producción han duplicado sus valores (Anangonó, 2007).

La Sierra Ecuatoriana posee varias zonas óptimas para la producción de esta fruta; zonas caracterizadas por un clima templado y fresco, y suelos con buen contenido de materia orgánica. Las provincias más representativas en el cultivo de esta fruta son: Tungurahua 39.2%, Chimborazo 22.2%, Azuay 14.1%, Pichincha 10.0%, Imbabura 4.8% (Anangonó, 2007).

2.1.3. Antracnosis en el Tomate de Árbol



Figura 1. Planta de tomate de árbol severamente afectadas por *Colletotrichum acutatum*.

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Uno de los problemas fitosanitarios más limitantes en el tomate de árbol es la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, que ataca frutos en cualquier estado de desarrollo. Los síntomas se manifiesta con mayor frecuencia en el ápice o en los puntos en que varios frutos de un mismo racimo

quedan en contacto, debido a que allí hay acumulación de agua por tiempo más prolongado, lo cual favorece el desarrollo inicial del hongo. El daño consiste en manchas ligeramente hundidas de color negro, que pueden llegar a cubrir todo el fruto. Bajo condiciones favorables al hongo, aparece un polvillo rosado en la superficie de la lesión, formado por esporas del patógeno. Cuando el ataque ocurre sobre frutos pequeños, estos se momifican y quedan adheridos al árbol. Si se presenta en frutos ya formados pero todavía verdes, aparece una coloración amarillenta de maduración prematura, con exhibición posterior de las manchas negras en el exterior, En caso de afectar frutos próximos a recolección, las manchas son pequeñas o aun inexistentes, pero el daño se manifiesta durante el transporte o el almacenamiento (Girard, citado por Botero, 1999).

En frutos maduros, los síntomas son fácilmente distinguibles, apreciándose manchas de color marrón oscuro, hundidas en la superficie y acompañadas de cierta emisión de gomas; frecuentemente aparece sobre la superficie del fruto un chorreado oscuro, debido a la acción de las esporas al ser arrastradas por el agua (rocío o lluvias); en su interior, los frutos presentan áreas negruzcas que inicialmente son blandas, pero que después *se* endurecen; finalmente estos órganos se pudren totalmente y se desprenden del árbol con facilidad (Agrios, citado por Botero 1999).

Las fructificaciones del hongo se pueden encontrar en numerosos órganos como ramas secas, partes muertas de las hojas, superficie de los frutos caídos y podridos; el hongo vive en todos estos órganos como saprofito (Kranz et al., citado por Botero, 1999).

Según Botero (1999), indica que existen factores agronómicos que favorecen el desarrollo del patógeno: Distancias de siembra inapropiadas, que dependen de la variedad utilizada, cuando se utilizan distancias cortas, las copas de los árboles se entrecruzan y se crean condiciones de humedad ambiental alta. Frecuencias cortas de fertilización y dosis inadecuada, principalmente de nitrógeno. En el tomate de árbol en algunos huertos no se realizan podas, por tanto los árboles desarrollan una copa cerrada, el crecimiento es rápido y hay fuente de inóculo permanente.

2.2. CULTIVO DE CHOCHO

2.2.1. Descripción del Cultivo

Esta planta presenta una gran variabilidad morfológica y de adaptación ecológica en los Andes, por lo cual se ha sugerido que puede incluirse a tres subespecies (Gross y Tapia, citado por FAO, 2000):

- *Lupinus mutabilis*, chocho (norte de Perú y Ecuador), de mayor ramificación, muy tardío, mayor pilosidad en hojas y tallos, algunos ecotipos se comportan como bianuales, tolerantes a la antracnosis.
- *Lupinus mutabilis*, tarwi (centro y sur de Perú), de escasa ramificación, medianamente tardío, algo tolerante a la antracnosis.
- *Lupinus mutabilis*, tauri (altiplano de Perú y Bolivia), de menor tamaño (1-1,40m) con un tallo principal desarrollado, muy precoz, susceptible a la antracnosis.

El chocho es una planta anual, con tallos de 40 a 120 cm de largo, cuando verde es macizo en su madurez es hueco. Sus hojas son compuestas; cada hoja está formada por 5 a 7 hojuelas unidas a la base. Cada hojuela tiene su nervadura central, y son pilosas. Las flores presentan un color violeta, la estructura central de color amarillo claro toma el nombre de (quilla), generalmente de color violeta. Las semillas son de color blanco, redondeadas, con un punto de color negro. El fruto es una vaina de color verde pálido cuando tierna, gris en su fase de madurez fisiológica y café obscura en la madurez de cosecha (Sánchez, citado por TIERRA ADENTRO, 2003).

Su centro de origen está ubicado en la región andina de Bolivia, Ecuador y Perú, ya que en ellas se encuentra la mayor variabilidad genética. En esta región se han identificado 83 especies del género *Lupinus* (Jacobsen y Mujica, 2006).

2.2.2. Importancia del Cultivo en el Ecuador

Se estima que la demanda insatisfecha de chocho desamargado es de 59% y que la demanda potencial actual es de 10.600Tn a nivel nacional, la misma que crecerá en los próximos años (Jacobsen y Sherwood, 2002). Existe un mercado potencial para la producción de materia prima (grano amargo) y grano desamargado, ya que la producción actual solo abastece el 41% de la demanda. Para el mercado internacional se espera una demanda creciente si la competitividad está dada en función de tres aspectos: sistema competitivo del país, capacidad de la empresa de adaptarse al mercado externo y conocimiento de los mercados.

El chocho seguido de cereales y otros cultivos es el sistema de rotación más importante en Chimborazo y Pichincha, mientras Imbabura tiene chocho seguido de maíz, cereales (cebada, trigo), leguminosas (vicia, lenteja pusa, fréjol) y papa. En cuanto a producción, el rendimiento promedio, por un tamaño promedio de la chacra de 0,97ha es 317 kg/ ha. Este rendimiento bajo se debe al ataque de plagas y enfermedades, falta de semilla de calidad y manejo deficiente de la fertilidad del suelo. De la producción total, el 82% se dedica para la venta, 8% para consumo familiar y 10% para semilla, de esta información se deduce que el autoconsumo no es significativo (Jacobsen y Sherwood, 2002).

2.2.3. Antracnosis en el Chocho

2.2.3.1. Síntomas

Causa pérdidas en el establecimiento de la siembra a través de la semilla contaminada. A mediados de la floración se presentan lesiones en los tallos severamente afectadas por *Colletotrichum lupini*. Destaca la típica curvatura de brotes de la enfermedad cerca de los ápices de crecimiento, los que se necrosan parcialmente, como consecuencia un sector del tallo sigue creciendo y se curva en forma de bastón. Si bien no se cuenta con mediciones de pérdidas comerciales con distintos niveles de infección, las sementeras afectadas han mostrado bajos rendimientos y menor calibre de los granos cosechados (Madariaga, 2008).



Figura 2. Planta de chocho severamente afectadas por *Colletotrichum acutatum*. Destaca la típica curvatura de brotes de la enfermedad.

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

2.2.3.2. Diseminación

Por el salpicado de conidias a causa de la lluvia desde los tejidos enfermos a tejidos sanos. Se caracteriza por ser transmisible por semilla y establecerse desde los primeros estados de desarrollo de las plantas, causando pérdidas de población inicial. Los granos de sementeras afectadas serán portadoras de la enfermedad, por lo tanto no pueden ser utilizados como semillas (Madariaga, 2008).

2.2.3.3. Supervivencia

La estación del chocho sobrevive en rastrojo de plantas enfermas. En Cañete la abundancia de chocho, *Lupinus arboreus*, el cual presenta síntomas y signos exactamente iguales a los detectados en lupino amarillo, hace postular un

importante rol de esta especie silvestre en la permanencia de la enfermedad (Madariaga, 2008).

2.3. RESISTENCIA EN PLANTAS

2.3.1. Resistencia de Plantas contra Enfermedades

La resistencia de las plantas a las enfermedades frecuentemente resulta de la interacción específica de genes de resistencia (R) de las plantas con los correspondientes genes de avirulencia (*Avr*) de los patógenos (García y Lozoya, 2004).

2.3.1.1. Mecanismos de defensa

La resistencia de las plantas está estrechamente correlacionada con la capacidad de respuesta de una planta hacia un organismo potencialmente patógeno. Generalmente los mecanismos de defensa que utilizan la plantas se pueden dividir en: a) mecanismos de defensa preexistentes o constitutivos, formados por las características estructurales de la pared celular y la presencia de compuestos químicos depositados en el tejido epidérmico, y b) mecanismos de defensa inducibles, formados por la síntesis de nuevos compuestos químicos antimicrobianos, cuya síntesis se activa después de un intento de invasión al tejido vegetal por un patógeno (García y Lozoya, 2004).

Como requisito para que una planta sea capaz de reconocer de manera eficiente a un patógeno, y por lo tanto de activar las respuestas de defensa apropiadas, se sugiere que hay receptores localizados en la membrana plasmática de las células vegetales encargados de activar las respuestas de defensa (García y Lozoya, 2004).

2.3.1.2. Genes de resistencia

Los patógenos producen una gran diversidad de señales y algunas de estas son detectadas por las plantas. Los genes de los patógenos que producen estas señales se denominan genes de avirulencia (Avr) si sus productos activan una respuesta de defensa en una planta con un gen de resistencia (R) apropiado (García y Lozoya, 2004). El resultado de esta interacción es la manifestación de la resistencia de la planta para ese patógeno específico. Sin embargo ante cualquier modificación a esta interacción, la planta manifiesta una respuesta de sensibilidad al patógeno y se puede establecer una enfermedad. La propuesta de la especificidad entre un gen (R) y un gen (Avr) y el término “resistencia gen por gen” fue publicada por Flor (García y Lozoya, 2004). Sus estudios derivaron en la propuesta de un modelo llamado “receptor – estimulador” usado para explicar el reconocimiento de un patógeno por una planta. Este modelo predice que los productos de los respectivos genes R y Avr interaccionan directa e indirectamente y que la percepción de la señal Avr por la proteína R activa las respuestas de defensa de las plantas (García y Lozoya, 2004).

2.3.1.3. Variación alélica entre genes R

Muchos patógenos vegetales pueden mutar con relativa facilidad de avirulentos a virulentos, y vencer la resistencia mediada por genes R específicos. La respuesta de las plantas a esta rápida evolución de los patógenos, resulta en la generación de nuevas características de resistencia para garantizar la sobrevivencia de la planta. En poblaciones vegetales silvestres, el polimorfismo en los genes R puede exceder grandemente al polimorfismo de otros genes no relacionados. Estudios genómicos y genéticos para analizar la evolución y el origen de la variación de los genes R demostraron que muchos de ellos, pero no todos, se encuentran agrupados en el genoma vegetal. El agrupamiento de estos genes puede permitir la generación de nuevas características de resistencia a través de la recombinación genética (García y Lozoya, 2004).

2.4. RESISTENCIA DEL CHOCHO A LA ANTRACNOSIS

Desde la década de 1990, el mayor desafío en la mejora del lupino ha sido el aumento de la resistencia hacia la antracnosis (Riegel *et al*, 2008). Por lo general, los ensayos de inoculación para la detección de genotipos tolerantes a la antracnosis se han llevado a cabo sólo con una cepa, asumiendo la baja diversidad de patógenos (Riegel *et al*, 2008). Sin embargo, este procedimiento puede ser peligroso y no contribuye a una tolerancia perdurable de los cultivares, teniendo en cuenta la existencia de muy diversos haplotipos de *C. acutatum*.

En Chile se han realizado diversos estudios en los que la variedad de chocho Tanjil se reporta como resistente, pero no inmune, y Kalya como moderadamente resistente. Igualmente se ha detectado tolerancia a la antracnosis en lupino de hoja angosta *L. angustifolius*, pero no ataques masivos en siembras comerciales (Mera, 2003).

Los programas de mejoramiento de *L. angustifolius* en Australia incorporaron, resistencia a *Stemphyllium vesicarium*, tolerancia a *Phomopsis leptostromiformis*, causante de la lupinosis en animales y resistencia a *Colletotrichum gloeosporioides*. Respecto de la antracnosis, estudios recientes han comprobado, en ensayos de inoculación artificial, que todas las variedades de *L. angustifolius* introducidas al país son susceptibles a la enfermedad. Este hallazgo es inédito para el lupino australiano, puesto que las variedades liberadas en Australia a partir de 1975 tienen genes de resistencia a antracnosis, lo que indicaría la presencia en Chile de una nueva raza del patógeno (Vallejos *et al*, 2003).

2.5. RESISTENCIA DEL TOMATE DE ÁRBOL A LA ANTRACNOSIS

Las plantas poseen diferentes mecanismos de defensa y adaptación a los microorganismos específicamente a hongos, tales como la producción de fitoanticipinas (defensas preexistentes) y fitoalexinas (Rueda *et al*, 2005). Al respecto, algunos autores han señalado que no existen hasta el momento variedades de tomate de árbol resistentes a la antracnosis (Saldarriaga 1997, citado por Rueda *et al*, 2005). Sin embargo, una investigación en la que se evaluó la resistencia a la

antracnosis de los frutos en tomate de árbol en el campo, sugiere la existencia de una posible resistencia a nivel de campo, del genotipo *Cyphomandra uniloba* (Rueda et al, 2005).

Rondón (2001) en su estudio realizado sobre la patogénesis de los aislados de *Colletotrichum* spp en tomate de árbol, demostró que la variedad roja es ligeramente más susceptible al ataque del patógeno que la variedad amarilla. El hecho de que los aislamientos de *Colletotrichum* fueran cultural y patogénicamente diferentes por sus características morfológicas y patogénicas, sugiere la posible existencia de otras subespecies o razas de este hongo afectando el tomate de árbol o a su vez una muy amplia variabilidad de *C. gloeosporioides*.

2.6. MÉTODOS DE INOCULACIÓN DE *Colletotrichum* spp

La inoculación de plantas con el patógeno suele ser esencial en estudios que requieren uniformidad de inóculo y reproducción de síntomas de la enfermedad. Esto ocurre en pruebas de patogenicidad, en pruebas de eficacia de métodos de control, en estudios de variabilidad de diferentes cepas de patógenos y en la evaluación de germoplasma para la resistencia a enfermedades (Souza *et al*, 2001).

En la práctica, parece que la gran diversidad de síntomas de antracnosis puede complicar la elección de método y la interpretación de los resultados. Métodos descritos en la literatura no son aplicables a todos los cultivos. La eficiencia reproductiva de cada tipo de síntoma y signo puede variar, por tanto se

debe elegir el método más adecuado. Esto es posible en base a los resultados comparativos de los diversos métodos (Souza *et al*, 2001).

Es necesario, por lo tanto, evaluar diferentes métodos de inoculación, con y sin lesiones, para comprobar su eficacia en el logro de síntomas y funcionalidad para su uso en la investigación (Souza *et al*, 2001).

Según Souza *et al* (2001), el trabajo que se desarrolló tuvo como objetivo comparar siete métodos de inoculación de fresa con *C. fragariae*. Los métodos utilizados por dichos autores fueron: 1) rociar las plantas con una suspensión de conidios, 2) el depósito de 5 ml de inóculo en la lesión del rizoma, hechas con lápiz, 3) pulverización de las plantas cuya pecíolos fueron heridos por aguja de punción (hipodérmica), 4) la deposición una gota de inóculo en la herida en el pecíolo, utilizando una aguja hipodérmica adjunta, 5) inyección de inóculo en el rizoma, 6) el depósito de los discos cultivo del hongo en el tallo, sin lesiones; y 7) la deposición del cultivo en placas de Petri en los pecíolos, previamente lesionado por punción con aguja hipodérmica.

2.7. ROTACIÓN DE CULTIVOS

2.7.1. Importancia de la Rotación de Cultivos

La rotación de cultivos es la siembra sucesiva de diferentes cultivos sobre la misma porción de terreno (National Research Council, Bullock, citado por Studdert, 2006).

Las ventajas de la rotación se contraponen con las desventajas del monocultivo (Power, Follet y Liebman, citado por Studdert, 2006), y sus beneficios para la producción de cultivos son conocidas desde antaño (Leigthy, Bullock y Pesek, citado por Studdert, 2006). Sin embargo, las condiciones agroecológicas o las socio-económicas de muchas zonas de producción, limitan la posibilidad de alternancia de cultivos y hacen que el monocultivo sea la única alternativa posible.

Todos los beneficios de la rotación sobre la producción, son por lo general referidos como el efecto rotación. Este término comprende la acción de la combinación de cultivos sobre la disponibilidad de nutrientes y agua; la dinámica de plagas, malas hierbas y enfermedades; la presencia de sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento; y sobre la condición del suelo (Power, Follet, Francis, Clegg y Bullock, citado por Studdert, 2006).

En términos generales, las ventajas de la rotación se relacionan con la posibilidad de manejar la cantidad y la calidad del material vegetal que se devuelvan al suelo; incorporar cultivos que fijen nutrientes o con distintos patrones de utilización de nutrientes y agua; manejar las malas hierbas, las plagas y las enfermedades; combinar sistemas de laboreo y agroquímicos, permitiendo una utilización más eficiente; y manejar la cobertura del suelo y sus propiedades químicas, biológicas y físicas (Terrón, citado por Studdert, 2006).

2.7.2. Amplio y Estrecho Rango de Hospederos

La rotación es uno de los métodos más importantes para discontinuar los requisitos de las plagas y de los agentes patógenos, y reducir sus formas de perpetuación (Zadocks, Schein y Pedigo, citados por Studdert, 2006). No obstante, la rotación no es efectiva para el control de cualquier tipo de plaga o enfermedad (Bullock, citado por Studdert, 2006).

La alternancia de cultivos será más efectiva para el control de especies con un estrecho rango de hospederos, con baja movilidad, que han formado o depositado sus órganos de perpetuación antes del nuevo cultivo, y que no sean capaces de vivir por mucho tiempo sin su hospedante (Luna, House, Bullocky Pedigo, citados por Sttudent, 2006).

Las formas de *Colletotrichum* tienen diferentes modelos de comportamiento en la naturaleza, variando de saprófito a cepas parasíticas especializadas con un estrecho rango de hospederos. Los conidios son producidos en masa mucilaginosas, a menudo rosadas, bastante conspicuas y típicamente hundidas, con un contorno irregular en las lesiones necróticas denominada (antracnosis) sobre frutos, hojas y tejidos (Contreras, 2006).

De la misma manera según Contreras (2006), las enfermedades causadas por *Colletotrichum* spp se presentan en un amplio rango de plantas hospederas distribuidas a nivel mundial registrándose tanto en precosecha como en poscosecha. La mayoría de las enfermedades de poscosecha exhiben el fenómeno de quiescencia

siendo las especies de *Colletotrichum* o *Glomerella*, patógenos que presentan dicho tipo de infección.

2.8. HERRAMIENTAS MOLECULARES

2.8.1. Métodos de Extracción

En la extracción de los ácidos nucleicos, estos se separan de cualquier otro compuesto proveniente de las células o del ambiente del cual se las tomaron. Inicialmente es necesario llevar a cabo una lisis para liberar al ADN del interior celular, para lo cual se utilizan los buffers de extracción que contienen 1) detergentes, como sodio dodecilo sulfato (SDS) a una concentración final del 1% o Triton X al 0.5%; 2) una molécula quelante (p. ej. EDTA, ácido etileno amino tetra acético, 50mM), que tiene cuatro grupos carboxilo y dos grupos amino, cuya forma completamente de-protonizada puede unirse a cualquier complejo metálico en solución, quitando a los cationes de la solución para desestabilizar la membrana celular e inhibir a las ADNasas; 3) sales (p.ej. cloruro de sodio, NaCl 20mM), que forman una capa iónica suave que recubre al ADN protegiéndolo y ayudando a evitar su degradación; 4) Tris-HCl 20mM con pH entre 7.5 y 8.2 para mantener el pH de la solución estable; 5) proteinasa K (concentración final 0.5 ml ml⁻¹) para degradar proteínas o enzimas (Eguiarte *et al*, 2007).

Durante este paso con buffer de extracción es común someter la muestra a tres o cuatro ciclos de incubación a temperaturas entre los 50°C y 70°C alternados con agitación de la muestra (manual, con vortex o en homogenizadores celulares utilizando micro esferas) e incubación a 4°C. La temperatura de incubación

no puede ser mayor a los 80°C, ya que a esta temperatura se comienza a degradar el ADN. Estas incubaciones facilitan la ruptura de lípidos en la membrana celular, permitiendo la liberación del ADN de la estructura celular.

Posteriormente, resulta necesario tratar las muestras con dos extracciones de fenol para eliminar las proteínas (como nucleasas); para ello se agrega fenol al mismo volumen de la muestra, se mezcla bien con vortex, se centrifuga a 10000 rpm (tres minutos), recuperando el sobrenadante con cuidado para no acarrear las proteínas que quedan en la interfase.

Después de la extracción con fenol, es común llevar a cabo otra extracción con cloroformo para acabar de limpiar la muestra de cualquier residuo lipídico. Una vez más, hay que agregar igual volumen de cloroformo que el de la muestra, mezclar bien (vortex) y centrifugar para recuperar el sobrenadante. Una vez concluido este paso, se lleva a cabo la precipitación del ADN con etanol absoluto y con una sal a alta concentración (p.ej. acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M; cloruro de sodio a una concentración final de 0.2 M; acetato de amonio a una concentración final de 2.5 M o cloruro de litio, concentración final 0.8 M). Por otra parte, con la adición de la sal, el ADN que está cargado negativamente va a obtener una capa iónica positiva que permite su precipitación.

Por otra parte, el alcohol en la solución de precipitación se utiliza para remover la concentración residual de sales y promover la precipitación del ácido nucleico. Cuando se trata de muestras con baja concentración de ácidos nucleicos, comúnmente se utiliza un volumen de muestra de isopropanol, en lugar de dos

volúmenes de muestra cuando se trabaja con etanol. La precipitación del ADN es casi inmediata en presencia de la sal y el alcohol, sin embargo se recomienda incubar la muestra durante 20 minutos a 80°C o durante 45 minutos a 20°C. Posteriormente, se centrifuga la muestra (15 minutos a 10000 rpm), se remueve la fase acuosa y se lava la pastilla de ADN con etanol al 70% para eliminar todas las sales que permanezcan en la solución.

Las muestras se vuelven a centrifugar (un minuto a 10000 rpm), se elimina el etanol y se deja secar el ADN (15 minutos a 37°C o media hora a temperatura ambiente) hasta que no haya más trazas de alcohol (Eguiarte *et al*, 2007).

2.8.2. Técnica de PCR

PCR son las siglas en inglés de “*Polymerase Chain Reaction*” o Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: *taq* polimerasa. Cuando hacemos una reacción de PCR simulamos lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que queremos estudiar donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar, los oligonucleótidos (llamados también *primers*, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, di nucleótidos (dNTPs), y las

condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de $MgCl_2$, KCl , y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa) (Eguiarte *et al*, 2007).

Teniendo los tubos listos con todo lo necesario para que la síntesis del fragmento que nos interesa se lleve a cabo (*taq* polimerasa, di nucleótidos, ADN, agua, buffer con magnesio y otras sales, y oligonucleótidos). El siguiente paso es colocar los tubos en una maquina conocida como termociclador, que básicamente sirve para calentarlos o enfriarlos a temperaturas muy precisas.

El termociclador calienta o enfría los tubos a tres temperaturas distintas, que se repiten una y otra vez (lo que se llama los ciclos de reacción), la primera es a $95^{\circ}C$ (y a este paso se le llama desnaturalización) durante la cual las dobles cadenas del ADN se abren o desnaturalizan, quedando en forma de cadenas sencillas (Figura 3); después el termociclador ajusta la temperatura en un intervalo entre 40° y $60^{\circ}C$ (llamada de alineamiento), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrogeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones más estables (las que son complementarias) duraran mayor tiempo, quedando los oligonucleótidos “alineados” formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido $5'$ a $3'$; al agregar unas bases mas, los puentes de hidrogeno que se forman entre las bases estabilizan mas la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso. Después la temperatura sube a $72^{\circ}C$ (paso que se conoce como extensión), ya que $72^{\circ}C$ es la temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continua la síntesis de los fragmentos de

ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado (Eguiarte *et al*, 2007).

En el primer ciclo, con estas tres temperaturas, se sintetizarán los primeros fragmentos a partir del ADN genómico. Estos primeros fragmentos no tendrán el tamaño esperado, serán un poco más grandes ya que la *taq* copiara hasta donde le sea posible, pero como veremos mas adelante, se obtendrán en cantidades tan pequeñas que al final no podremos detectarlos. Después se repiten una vez más las tres temperaturas, pero en este segundo ciclo, los oligonucleótidos, además de unirse al ADN que pusimos al inicio, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo (ver segundo ciclo de la figura 3), por lo tanto en este segundo paso la polimerasa sintetizará 2 fragmentos largos copiados directamente del ADN y 2 fragmentos del tamaño esperado, que es el tamaño que hay entre los dos oligonucleótidos que hemos usado. De esta forma con cada ciclo aumentará el número de fragmentos del tamaño que queremos. Cabe mencionar que antes y después de estos ciclos se programan dos pasos, uno de 95°C durante varios minutos para iniciar con desnaturalización, y al final de los ciclos, un paso ultimo de extensión a 72°C para permitir que la *taq* termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.

Para este tipo de PCR es necesario que uno de los oligonucleótidos tenga la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN, y el otro deberá llevar la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar (por lo cual se les llama *forward* y *reverse*) para que uno sea complementario a la cadena que forma el otro; si no es así no podría amplificarse el

sitio que se necesita. Como cada pedazo sintetizado sirve como base para sintetizar otros en el siguiente ciclo, el número de copias aumentará en forma exponencial (ver tercer ciclo de la figura 3). Con una sola molécula de ADN, en el ciclo 1 se producen $2^1=2$ nuevos fragmentos, en el ciclo 2 serán 4, esto es, 4 fragmentos recién sintetizados, y así, con 35 ciclos de PCR se producirán $2^1+2^2+\dots+2^{34}+2^{35}=2^{36}-2=67108864-2=67108862$ nuevos fragmentos, de los cuales solo 70 serán fragmentos de un tamaño mayor al esperado (2 por cada ciclo) obtenidos al sintetizarlos directamente del ADN genómico; esta pequeña cantidad es casi imposible de detectar al analizar los productos.

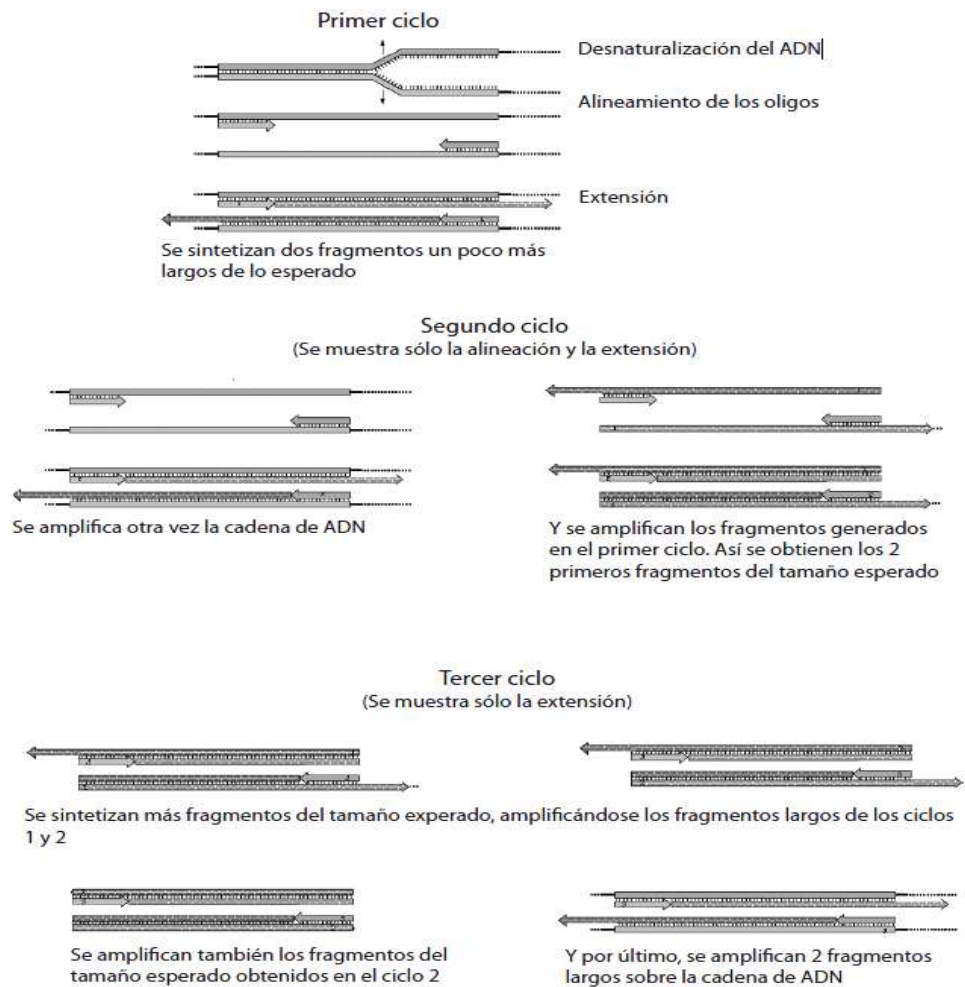


Figura 3. Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción. Comúnmente se utilizan 35 ciclos para amplificar el fragmento que se requiere. Fuente: Parkers, citado por Eguiarte *et al*, 2007.

2.8.3. Métodos para Visualizar la PCR

Para analizar el o los fragmentos obtenidos en el PCR, se utiliza la electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de acrilamida, la electroforesis permite separar estos fragmentos de acuerdo al tamaño de cada uno. Tanto la agarosa como la acrilamida forman una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, por la cual obligamos a pasar los fragmentos de ADN, “jalándolos” a través de corriente

eléctrica, hacia el polo positivo, ya que la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato (P-) (Eguiarte *et al*, 2007).

2.8.3.1. Métodos para geles de agarosa

Será necesario tener en el laboratorio equipo que permita trabajar con los geles: una cámara de electroforesis, una fuente de poder, un transiluminador de luz UV y equipo de fotografía (lo más sencillo: una cámara polaroid, un filtro para luz UV y un cono adaptado a la cámara, o también existen cámaras especiales y equipo de cómputo específico para ello) para guardar la imagen del gel. Para empezar hay que preparar el buffer de corrida.

El buffer más común es el TBE (Tris Boratos EDTA), que por ser muy estable puede reutilizarse varias veces. También se utiliza con frecuencia el buffer TAE (Tris Acetatos EDTA), que es menos estable que el TBE y tiende a ionizarse más rápido, pero permite obtener mejor separación de bandas, sobre todo si son de gran tamaño (1 Kb o más) (Eguiarte *et al*, 2007).

La agarosa se disuelve en el mismo buffer que se utiliza para la corrida, y se calienta hasta ebullición para disolver bien el polvo. Cuando se enfríe y solidifique se agrega el buffer necesario hasta cubrir bien el gel (Eguiarte *et al*, 2007).

2.8.3.2. Cargando el gel

Con una pipeta, cada muestra se vierte en un pozo, mezclada previamente con 1 o 2 micro litros de colorante de corrida. Generalmente los colorantes de corrida llevan alguna sustancia espesa, como glicerol o sacarosa, que permite que la muestra caiga hacia el fondo del pozo, y los colorantes (como el xilen-cianol o azul de bromofenol) dan una idea de como van migrando los fragmentos (en un gel de agarosa al 1%, el azul de bromofenol migra junto con los fragmentos de 300 pb, y el xilen-cianol migra igual que los fragmentos de 4 Kb) (Eguiarte *et al*, 2007).

Por lo menos un carril del gel siempre deberá tener un marcador de peso molecular como control para saber el tamaño de las bandas que se tendrán. Tampoco debe olvidarse poner en el gel los controles negativo y positivo (Eguiarte *et al*, 2007).

2.8.3.3. Tinción del gel

Lo más común es utilizar bromuro de etidio, que es una molécula con dos propiedades importantes: se intercala en las bases del ADN y brilla con luz UV a una longitud de onda determinada (264-366 nm) con lo cual se observa las bandas de ADN en el gel (Eguiarte *et al*, 2007).

2.9. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp.

El uso de técnicas moleculares ha posibilitado la distinción entre especies de este género, datos derivados de análisis de ácidos nucleicos son la herramienta más confiable para construir la clasificación de *Colletotrichum* (Rodríguez, 2007).

En estudios de *Colletotrichum*, el trabajo se ha concentrado en dos partes del genoma, mitocondrial (ADNm) y ribosomal (ADNr). Ambos están presentes como múltiples copias dentro de la célula las cuales permiten el análisis bajo condiciones experimentales menos severas. Además de estos genes en los últimos años se ha incrementado el uso de secuencias de genes como la β -tubulina y el factor de elongación 1 alpha (EF-1 α) (Freeman y Katan, citados por Rodríguez, 2007).

Se han usado primers arbitrarios (decámeros) para detectar la diversidad genética en *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* (Bridge *et al*, citados por Rodríguez, 2007). En esos análisis los fragmentos generados sugirieron que *C. acutatum* podría estar ubicado en siete grupos, con menores variaciones dentro de un grupo. Las cepas de Europa tuvieron patrones idénticos de RAPD y fueron distintos de las cepas americanas las cuales estuvieron muy relacionadas entre ellas pero no idénticas. Las cepas de *C. gloeosporioides* no mostraron variación y fueron idénticos a un grupo de *C. fragariae*. Con análisis de RFLP se observaron altos niveles de variación entre las cepas de *C. gloeosporioides* de plantas tropicales,

con la excepción de cepas obtenidas de mango donde fueron encontrados pocos polimorfismos (Prusky *et al*, citado por Rodríguez, 2007).

La identificación de especies por métodos tradicionales (morfología, color de la colonia, tamaño de conidia), pueden no ser suficientes para la identificación de especies y subespecies, lo cual es crítico para el manejo de la enfermedad, mejoramiento y control del patógeno. La certificación de la compatibilidad vegetativa y el uso de técnicas moleculares ofrecen medidas complementarias para la caracterización confiable de la taxa; así como la diversidad genética de poblaciones de *Colletotrichum*. En recientes estudios se han utilizado primers específicos de especies para diferenciar entre aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* de cítricos; además los aislamientos de *C. acutatum* provenientes de un amplio rango de hospederos fueron confiablemente agrupados y delineados del aislamiento de *C. gloeosporioides* usando primers específicos de *C. acutatum*. Del mismo modo, usando primers específicos de *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*, aislamientos de esta especie se distinguieron de *C. acutatum* (Prusky *et al*, citado por Rodríguez, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. Ubicación Política

La investigación se llevó a cabo en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, Hacienda el Prado, en los laboratorios e invernaderos del área de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias – I.A.S.A.

3.1.2. Ubicación Geográfica

La ubicación geográfica en donde se realizó el trabajo de invernadero se encuentra descrita a continuación y la ubicación visual en el plano topográfico.

Longitud: 78°24`44`` O Latitud: 0°23`20`` S Altitud: 2721 msnm



Figura 4. Localización geográfica de la Hacienda el Prado (IASA).

Fuente: Google earth, 2012.

3.1.3. Ubicación Ecológica

Los datos climáticos durante la época de ejecución del estudio son los siguientes:

Tabla 1. Datos meteorológicos de la Hacienda el Prado.

	PROMEDIO ANUAL
Altitud:	2748 msnm
Latitud:	0 °23'20''
Longitud:	78 °24'44''
Temperatura promedio:	14,19 °C
Temperatura máxima:	20.65 °C
Temperatura mínima:	7,42°C
Humedad relativa:	67,11%

Fuente: Estación Meteorológica IASA, 2011.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales para la Fase de Laboratorio

Caracterización morfológica de poblaciones de *Colletotrichum* spp:

- Ramas y tallos de chocho colectados en Imbabura, Pichincha y Tungurahua (Enero-Febrero del 2011) con síntomas característicos de antracnosis.
- Frutos de tomate de árbol colectados en Imbabura, Pichincha y Tungurahua (Enero-Febrero del 2011) con síntomas característicos de antracnosis.
- Para la desinfección se utilizó jabón líquido, hipoclorito al 0.5% y agua estéril.
- Cajas Petri (x10), porta y cubre objetos, medio Agar Papa Dextrosa (100g), Tween 80, KOH, alcohol antiséptico, estreptomina, autoclave, mechero, incubadora, microscopio, balanza, NaOH, papel filtro, sacabocado, medio Agar Agua, cámara de flujo Laminar, estufa.

Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp:

- 5 cultivos monospóricos provenientes de frutos de tomate de árbol
- 5 cultivos monospóricos provenientes de ramas y tallos de chocho.

- Bisturí, morteros, estufa, autoclave, mechero, alcohol potable, Nitrógeno líquido, kit de extracción de ADN para hongos Omega, baño maría, termociclador, foto documentador, vortex, microcentrífuga, cámara de electroforesis, cámara de flujo laminar, incubadora, pipetas volumétrica de 0.5-10ul, pipetas volumétrica de 2-20ul, pipetas volumétrica de 10-100ul, pipetas volumétrica de 100-1000ul, pipetas volumétrica de 5ml, probeta plástica de 50ml, probeta plástica de 100ml, erlenmeyer de 250ml, gel de Agarosa, primers (ITS1, ITS4, CaInt2, CgInt), TAE 1X, buffer corrida, marcador comercial de 100 bp, Bromuro de Etidio, parafilm.

3.2.2. Materiales para la Fase de Invernadero

Producción de plantas de chocho y tomate de árbol:

- Semillas de tomate de árbol variedades común y gigante común
- Semillas de chocho de 3 genotipos selectos (F8, 712-1, 722-4)
- Sustrato para el tomate de árbol 2:1:1 (tierra negra, cascarilla de arroz, fibra de coco).
- Sustrato para el chocho 1:1:1 (tierra negra, pomina, fibra de coco).
- 150 macetas
- Regadera

Producción de inóculo:

- 90 plantas de tomate de árbol variedad común y gigante común
- 60 plantas de chocho de 3 genotipos selectos (F8, 712-1, 722-4)
- 5 aislamientos puros extraídos de frutos de tomate de árbol

- 5 aislamientos puros extraídos de ramas y tallos de chocho.
- Frascos de vidrio (x20), probeta plástica de 100ml, vasos de precipitación de 100ml, porta y cubre objetos, placa de Neubauer, microscopio, pipetas volumétrica de 2 -20ul.

3.2.3. Materiales de Oficina

- Libreta de campo, computadora, impresora, hojas de papel bond

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Fase Experimental de Laboratorio

3.3.1.1. Caracterización morfológica de poblaciones de *Colletotrichum* spp.

Se aislaron muestras de *Colletotrichum* spp de tallos, vainas y semillas de chocho (*L. mutabilis*) y frutos de tomate de árbol (*S. betacea*) con síntomas característicos de antracnosis, de diferentes localidades de la serranía ecuatoriana. Cada muestra se etiquetó con el nombre del lugar y la localización geográfica.

Cuadro No 1. Posición geográfica de las localidades donde se tomaron muestras con síntomas característicos de antracnosis en tomate de árbol y chocho.

CULTIVO CHOCHO		
PROVINCIA	LOCALIDAD	POSICIÓN
Ambato	Sigchos	N 0759635
		E 9917749
Ambato	Santa Ana	N0762995
		E 9915856
Ibarra	Zona 1	N 0805478
		E 0023198
Ibarra	Zona 2	N 0808523
		E 0034031
Pichincha	IASA	-3857416
		-78.415.013

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Para aislar el patógeno se cortaron los fragmentos infectados, se lavaron con agua corriente durante diez minutos, seguido de tres lavados de un minuto con hipoclorito al 0.5% y finalmente uno con agua estéril por un minuto. Los fragmentos desinfectados se sembraron en 5 cajas Petri para los aislamientos de chocho y en otras 5 cajas Petri para los aislamientos de tomate de árbol. Las cajas tuvieron medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) más sulfato de estreptomicina ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$). Las cajas se incubaron a 25°C durante 10 días. Las colonias que mostraron un crecimiento significativo y morfología típica de *Colletotrichum* fueron transferidas a nuevas cajas Petri con PDA más estreptomicina, hasta obtener cultivos puros (Falconí, 1998).

Para obtener cultivos monospóricos se suspendió 1×10^4 esporas/ml de cada aislamiento de *Colletotrichum* en solución salina (0.5%) más Tween 80 (0.1%). De esta suspensión se tomó con el aza de transferencia una gota y se colocó en una caja

Petri con Agar agua, donde se extendió en forma de cuadrícula para diseminar las esporas. Mediante un estereomicroscopio se señaló una espora de *Colletotrichum* de cada aislamiento, la cual se extrajo con un sacabocado para sembrarla en una nueva caja Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA), obteniendo tres cajas por cada aislamiento. Estas cajas se mantuvieron a 25 °C de temperatura durante 10 días. Finalmente se guardaron las esporas en rodajas de papel filtro esterilizado en viales para próximas multiplicaciones (Falconí, en prensa).

Una vez que los aislamientos tuvieron un crecimiento significativo procedimos a recopilar la información de las variables para la descripción macro y microscópica del patógeno.

- Color y forma de la colonia: con una regla se midió el largo y el ancho de la colonia y se observó el color en el haz y el envés de la caja Petri.
- Aspecto micelio: se observó el aspecto del micelio solo en el haz de la caja Petri.
- Forma y tamaño de la conidia: Esta variable se determinó mediante un microscopio óptico de luz. Para las mediciones se utilizó un micrómetro ocular adaptado al ocular y calibrado para el objetivo de inmersión.

3.3.1.2. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp.

Los 5 cultivos monospóricos de chocho y los 5 de tomate de árbol se sembraron en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubaron 5 días a 25 °C (Talhinhas *et al.*, 2002).

La extracción de ADN se realizó mediante el kit de extracción Omega, específico para hongos, siguiendo el procedimiento del fabricante con una ligera modificación, el cual se detalla a continuación:

- Triturar (muy bien) aproximadamente 100mg del micelio con ayuda del nitrógeno líquido.
- Añadir 600ul de Tampón FG1 (añadir 5ul de RNase 20mg/ ml y 10ul de 2-mercaptoethanol).
- Poner a 65° C durante 10 min. Mezclar mediante inversión de tubo.
- Añadir 140ul de Tampón FG2 (vortex).
- Centrifugar 10000 x 10min.
- Recoger 600ul en un nuevo tubo eppendorf.
- Añadir 300ul de Tampón FG3.
- Añadir 600ul de etanol absoluto (vortex).
- Ponerlo en una columna (2 veces).
- Centrifugar 10000 x 1min.
- Lavar con 750ul de Wash Buffer (repetir 2 veces). Centrifugar 10000 x 1min.
- Centrifugar a máxima velocidad x 2min para secar la columna.

- Transferir a otro tubo eppendorf y añadir 100ul de agua a 65° C (FRACCIÓN A).
- Para incrementar la concentración de DNA, poner el agua e incubar la columna 5min a 65° C.
- Esperar 1min y centrifugar a10000 x 1min.
- Volver a recoger con 100ul de agua a 65° C. (FRACCION B).

Para empezar se preparó 1 litro de buffer de corrida amortiguador TAE 10X el cual consta de: Tris base (48.40g), NaOAc (4.10g), Na₄EDTA(2.92g) (CIMMYT, 2006) luego se obtuvo el TAE 1X al diluir el TAE 10X, que es el que fue utilizado para la corrida del DNA.

Para visualizar el DNA se utilizó un gel de agarosa al 0.8% en TAE (Tris-acetate-EDTA)1X. Se tomó 1ul del colorante de corrida (Blue Juice) y 4ul de cada muestra de DNA, se colocó en la cámara de electroforesis y se dejó migrar en TAE 1X a 100 Voltios durante 1 hora. Como peso molecular estándar se utilizó marcador comercial de 100 bp (INVITROGEN).

Para detectar los fragmentos de DNA se utilizó una solución de TAE 1X con Bromuro de Etidio al 0,05% y se visualizó bajo una lámpara de luz ultravioleta y en un foto documentador (LMS-20F).

Una vez obtenido el DNA de los aislamientos de chocho y tomate de árbol se procedió a realizar la amplificación de secuencias de las regiones ITS del rRNA por medio de PCR. Además se añadieron controles que fueron el control positivo para cada una de las dos especies y un control negativo con agua molecular. La

identificación molecular de las dos especies de *Colletotrichum* se realizó mediante una prueba de diagnóstico con cebadores específicos de *C. gloeosporioides* (CgInt) y de *C. acutatum* (CaInt2), en combinación con el iniciador universal ITS4 (Talhinhas *et al.*, 2002).

A continuación se detallan las secuencias de los iniciadores a utilizarse:

Tabla 2. Secuencias de iniciadores o primers a usarse en la caracterización molecular de *Colletotrichum* spp.

Nombre del iniciador	Secuencia nucleotídica 5' →3'	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> ,1990
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> ,1990
CaInt2	GGGGAAGCCTCTCGCGG	Sreennivasaprasad <i>et al.</i> ,1996b
CgInt	GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG	Mills <i>et al.</i> , 1992

Fuente: Talhinhas *et al.* 2002.

Para la PCR se utilizó Buffer 10x, MgCl₂ 50uM, dNTPs 25Um, ITS1, ITS4, CaInt₂, CgInt, TAQ, Agua Molecular y DNA de cada aislamiento.

Tabla 3. Condiciones estándar para un PCR (cálculos para 50ul en cada tubo).

	Concentración Inicial	Volumen (1muestra)	Master mix (4 muestras)
Buffer	10x	5ul	20ul
MgCl ₂	50nM	2ul	8ul
dNTPs	25nM	0.4ul	1.6ul
ITS1	100pM	0.25ul	0.25ul/muestra
ITS4	100pM	0.25ul	0.25ul/muestra
Taq	5U/ul	0.4ul	0.4ul/muestra
Agua Molecular		33.7ul	134.8ul
ADN		8ul	8ul/muestra

Fuente: Falconí, 2012.

Tabla 4. Condiciones estándar para un PCR (cálculos para 50ul en cada tubo)

	Concentración Inicial	Volumen (1muestra)	Master mix (10 muestras)
Buffer	10x	5ul	50ul
MgCl ₂	50nM	2ul	20ul
dNTPs	25nM	0.4ul	4ul
CaInt2/CgInt	100pM	0.25ul	2.5ul
ITS4	100pM	0.25ul	2.5ul
Taq	5U/ul	0.4ul	4ul
Agua Molecular		33.7ul	337ul
ADN		8ul	

Fuente: Falconí, 2012.

Las reacciones de amplificación con los iniciadores ITS1 e ITS4 se efectuaron en un termociclador con la siguiente programación: 1 ciclo de 2 min a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 1 min a 44°C (anidamiento), 1 min a 72°C (extensión), terminando con 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. Dando un total de 40 ciclos en dos horas y media y conservándolo a 4°C.

Las reacciones de amplificación con los iniciadores CaInt2, CgInt e ITS4 se efectuaron con la siguiente programación: 1min (95°C), 1min (58°C) y 1min (72°C). Dando un total de 35 ciclos y conservándolo a 4°C.

Para visualizar las amplificaciones se utilizó un gel de agarosa al 1,5% en TAE (Tris-acetate-EDTA)1X. Se tomó 1ul del colorante de corrida (Blue Juice) y 4µl de cada muestra (producto del PCR), se colocó en la cámara de electroforesis y se dejó migrar en TAE 1X a 100 Voltios durante 1 hora. Como peso molecular estándar se utilizó marcador comercial de 100 bp (INVITROGEN).

Para detectar los fragmentos de DNA se utilizó una solución de TAE 1X con Bromuro de Etidio al 0,05% y se visualizó bajo una lámpara de luz ultravioleta y un foto documentador (LMS-20F).

Productos de PCR usando ITS1 e ITS4 como primers fueron enviados MAGROGEN – EE.UU, para su secuenciación. Una vez identificados las especies de *Colletotrichum* presentes en los aislamientos de las plantas de chocho y tomate de árboles recolectados, se procedió a analizar las secuencias de las mismas para proceder a utilizar herramientas bioinformáticas como Clustal X, UPGMA, GenBank

etc. Se consideró secuencias del GenBank de aislamientos de *Colletotrichum* de chocho identificados en estudios realizados por Talhinhos *et al.* (2002) y Nirenberg *et al.* (2002) para determinar la distancia genética de los aislamientos de *Colletotrichum* de Ecuador, graficando sus relaciones fenéticas.

Tabla 5. Espaciador transcrito interno 1 y 2 secuencias de aislados de *Colletotrichum* utilizados en este estudio

Isolate code	EMBL accession	Determination by the authors as	Host	Country
BBA 70343 PD 93/1373	AJ301915	<i>C. acutatum</i> ^a	<i>Primula</i>	Netherlands PD
BBA 70344 PD 93/1436	AJ301916	<i>C. lupini</i> var. <i>setosum</i> ^a	<i>Lupinus</i> sp.	Netherlands PD
BBA 700073	AJ301927	<i>C. lupini</i> var. <i>setosum</i> ^a	<i>Lupinus polyphyllus</i> hyb	Germany
BBA 63879	AJ301930.1	<i>C. lupini</i> var. <i>lupine</i> ^a	<i>Lupinus mutabilis</i>	Bolivia
BBA 70884	AJ301948	<i>C. lupini</i> var. <i>lupine</i> ^a	<i>Lupinus albus</i>	Ukraine
	AJ300558	<i>Colletotrichum</i> sp. ^b	<i>Lupinus angustifolius</i>	Portugal
	AJ300563	<i>Colletotrichum</i> sp. ^b	<i>Lupinus mutabilis</i>	Portugal
	AJ311391	<i>C. acutatum</i> ^b	<i>Lupinus albus</i>	Canada
	AJ300558	<i>C. acutatum</i> ^b	<i>Lupinus albus</i> .	Portugal
	AJ749674	<i>C. acutatum</i> ^c	<i>Olea europea</i> subsp. <i>europaea</i>	Portugal
	AJ749679	<i>C. acutatum</i> ^d	<i>Olea europea</i> subsp. <i>europaea</i>	Portugal
	AM991131	<i>Glomerella acutata</i> ^e	<i>Olea europea</i> subsp. <i>europaea</i>	Portugal
	AM991137	<i>Glomerella acutata</i> ^e	<i>Olea europea</i> subsp. <i>europaea</i>	Portugal
Lup 1	JN543059 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
Tam 6	JN543069 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Solanum betaceum</i>	Ecuador
Tam 7	JN543070 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Solanum betaceum</i>	Ecuador
Lup 12	JN543060 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
Lup 14	JN543061 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
Lup 16	JN543062 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
Lup 18	JN543063 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
Tam 20	JN543071 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Solanum betaceum</i>	Ecuador
Lup 21	JN543064 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
Lup 24	JN543065 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
Lup 28	JN543066 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
Lup 30	JN543067 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
Lup 31	JN543068 ^f	<i>C. acutatum</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	Ecuador
	AF521205	<i>C. acutatum</i> ^g	<i>Solanum betaceum</i>	Colombia
	AF521210	<i>C. acutatum</i> ^g	<i>Solanum betaceum</i>	Colombia
345034	AJ536207	<i>C. acutatum</i> ^h	<i>Fragaria x ananassa</i>	Australia
356878	AJ536229	<i>C. gloeosporioides</i> ^h	<i>Fragaria x ananassa</i>	Italy
345047	AJ536223	<i>C. fragariae</i> ^h	<i>Fragaria x ananassa</i>	USA
347765	AJ536231	<i>C. falcatum</i> ^h	<i>Fragaria x ananassa</i>	Bangladesh

Fuente: Falconí C.E. (2012) Characterization of *Colletotrichum acutatum*, the causal agent of anthracnose in lupin (*Lupinus mutabilis*) and tamarillo (*Solanum betaceum*), from Ecuadorian Andes. PhD. Thesis, Wageningen University. p.57

^a Isolate sequenced by H.I. Nirenberg et al. 2002 *Mycologia* 94(2), 307–320

^b Isolate sequenced by Talhinhos et al. 2002 *Phytopathology* 92 (9), 986-996

^c Isolate sequenced by Talhinhos et al. 2005 (EMBL direct submission)

^d Isolate sequenced by Talhinhos et al. 2005 *Appl. Environ. Microbiol.* 71(6), 2987-2998

^e Isolate sequenced by Talhinhos et al. 2009 *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 31-38

^f Isolates sequenced by Falconi C.E. (2012) (EMBL accession number)

^g Isolate sequenced by Afanador et al. 2003 *Phytopathology* 93(5), 579-587

^h Isolate sequenced by P.V. Martinez-Culebras et al. 2003 *J. Phytopathology* 151, 135–143

3.3.2. Fase Experimental de Invernadero

3.3.2.1. Siembra de semillas de chocho y tomate de árbol

Se procedió a preparar el sustrato donde se sembraron las semillas de chocho (desinfectadas con hipoclorito al 0.5%), el cual constó de tierra negra, pomina y fibra de coco en relación 1:1:1. La siembra se realizó en macetas con el sustrato mencionado con 3 semillas por cada maceta.

Se preparó el sustrato donde se sembraron las semillas de tomate de árbol (desinfectadas con hipoclorito al 0.5%), el cual constó de tierra negra, cascarilla de arroz y fibra de coco en relación 2:1:1. La siembra se realizó en platabandas con dos semillas por sitio, luego se trasplantó cuando las plántulas alcanzaron una altura de 12-15cm, una por maceta para la respectiva inoculación.

Las plantas de tomate de árbol se las sembró antes que las del chocho, debido a su ciclo de cultivo, que fueron 3 y 1.5 meses respectivamente. Una vez obtenida la altura necesaria se trasladaron al umbráculo para su posterior inoculación.

3.3.2.2. Inoculación en las plantas de chocho y tomate de árbol.

Se tomó 15ul de suspensión de esporas (solución salina 0.5%+tween80 0.1%) de cada aislamiento y se sembró en cajas Petri con medio de cultivo PDA y estreptomicina ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$). Las cajas Petri se mantuvieron a 25°C de temperatura durante 8 días. Al octavo día se realizó la cosecha y conteo de esporas con una cámara de Neubauer de cada uno de los aislamientos de *Colletotrichum* 1×10^5 esporas/ml.

Una vez colectado el inóculo de cada aislamiento de *Colletotrichum* usando una aguja hipodérmica se realizó dos heridas en los tallos de tomate de árbol y una herida en los 3 tallos de chocho, donde se inyectó 15 μl de la suspensión de esporas de cada aislamiento.

Para evaluar la reacción de las plantas se usó una escala de severidad: 1 = la inmunidad, sin ningún tipo de lesión o arruga de folíolos, 2 = lesiones muy pequeñas en hojas (menos de 2 mm), esporulación ausente esporádica y localizada, 3 = zona apical del tallo central se duplica debido a la infección, poca esporulación, 4 = presencia de lesiones medianas (2-5 mm) en la región meristemática o en el punto de lesión que se realizó, acompañado de poca esporulación 5 = presencia de lesiones (más de 5 mm) sobre el tallo principal o en la zona de meristemas con tejido necrótico, acompañado por el colapso de los tejidos (esporulación abundante), 6 = plantas severamente afectadas y necróticas, o plantas muertas. Escala de antracnosis con apariciones en las plantas (1-2 reacción incompatible - reacción resistente, 3-6

reacción compatible - reacción susceptible) (Falconí, en prensa). Considerando las lesiones causadas a los 10, 15, 20 y 25 días posteriores a la inoculación.

Finalmente se realizó un re-aislamiento del hongo desde las hojas y tallos de chocho y de tomate de árbol, los mismos que fueron purificados para verificar que los aislamientos procedieron de las muestras de *Colletotrichum* obtenidas anteriormente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DIÁMETRO Y ÁREA DE LA COLONIA DE AISLAMIENTO DE CHOCHO

El análisis de varianza para el diámetro y el área de la colonia de *C. acutatum* no encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para cada una de estas variables (Cuadro 2).

Los promedios generales para el diámetro mayor y menor fueron: de 48.40 y 45.27 mm, respectivamente, mientras que el área fue de 1779.98 mm², con coeficientes de variación de: 16.04, 14.40 y 28.33%, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro No 2. Análisis de varianza para el diámetro y área de la colonia de 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis en el cultivo de chocho (*L. mutabilis*), IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011

FUENTES DE VARIACIÓN	gl	DIÁMETROS (mm)		ÁREA DE LA COLONIA (mm ²)
		MAYOR	MENOR	
TOTAL	14			
TRATAMIENTOS	4	192.23 ns	128.57 ns	829990.15 ns
ERROR	10	60.27	42.47	254260.10
X(mm)		48.40	45.27	1779.98
CV (%)		16.04	14.40	28.33

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Si bien los aislamientos no se diferenciaron estadísticamente para cada una de estas tres variables, los mayores promedios del diámetro mayor, del diámetro menor y del área de la colonia correspondieron a los aislamientos CA2 y CA3. Mientras que el menor promedio correspondió al aislamiento CA1 (Cuadro 3).

Cuadro No 3. Variabilidad en el tamaño de la colonia en 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis en el chocho (*L. mutabilis*)

TRATAMIENTOS (AISLAMIENTOS)	DIÁMETROS (mm)		ÁREA DE LA COLONIA (mm ²)
	MAYOR	MENOR	
CA1	40.33	39.33	1277.84
CA2	56.67	53.67	2405.94
CA3	57.33	50.67	2277.13
CA4	44.67	43.00	1576.03
CA5	43.00	39.67	1362.93

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.2. DIÁMETRO Y ÁREA DE LA COLONIA DE AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL

El análisis de varianza para el diámetro y el área de la colonia de *C. acutatum* no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para cada una de estas variables (Cuadro 4).

Los promedios generales para el diámetro mayor y menor fueron: de 43.00 y 39.73 mm, respectivamente, mientras que la superficie fue de 1374.45 mm², con coeficientes de variación de: 16.17, 18.35 y 40.35%, respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro No 4. Análisis de varianza para el diámetro y área de la colonia de 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis del tomate de árbol (*S. betaceum*). IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011.

FUENTES DE VARIACIÓN	gl	DIÁMETROS (mm)		ÁREA DE LA COLONIA (mm ²)
		MAYOR	MENOR	
TOTAL	14			
TRATAMIENTOS	4	26.67 ns	69.90 ns	304577.91 ns
ERROR	10	48.33	53.13	307629.62
X(mm)		43.00	39.73	1374.45
CV (%)		16.17	18.35	40.35

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Si bien los aislamientos no se diferenciaron estadísticamente en cada una de estas tres variables en estudio, el mayor promedio del diámetro mayor, del diámetro menor y del área de la colonia correspondieron al aislamiento TA4 y solo el diámetro menor y área de la colonia para TA5. Mientras que el menor promedio correspondió a los aislamientos TA1, TA2, TA3 para el diámetro mayor y menor y solo el TA1 para el área de la colonia (Cuadro 5). Estos datos indican una ligera variabilidad en la morfología sin que ésta sea significativa ($p < 0.05$).

Cuadro No 5. Variabilidad en el tamaño de la colonia en 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis en tomate de árbol (*S. betaceum*)

TRATAMIENTOS (AISLAMIENTOS)	DIÁMETROS (mm)		ÁREA DE LA COLONIA (mm ²)
	MAYOR	MENOR	
TA1	41.67	37.33	1221.30
TA2	41.67	37.33	1225.22
TA3	41.67	37.33	1225.22
TA4	48.33	48.33	1943.86
TA5	41.67	38.33	1256.64

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.3. FORMA DE LA COLONIA DE LOS AISLAMIENTOS DE CHOCHO

El 70% de los aislamientos manifestaron colonias de forma oval y 30% circular, a excepción de las colonias del CA2 que presentaron el 100% forma oval (Gráfico 1).

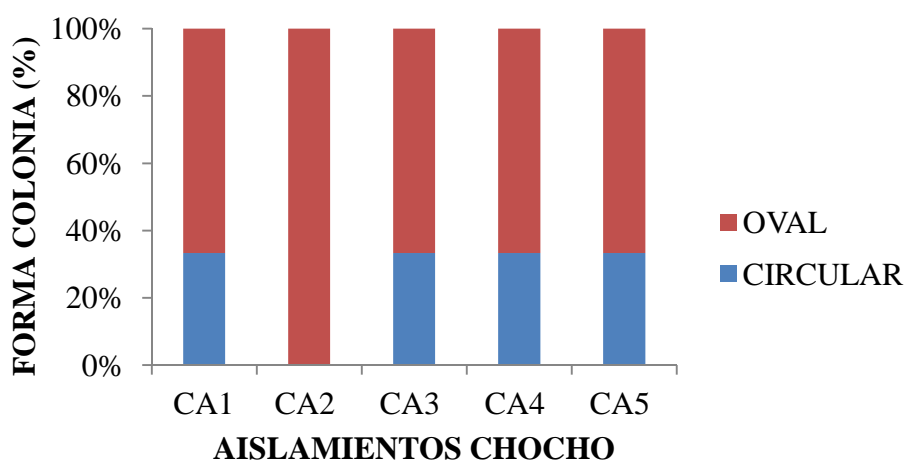


Gráfico No 1 Análisis comparativo de la forma de la colonia para 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis del chocho.

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.4. FORMA DE LA COLONIA DE LOS AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL

El 66.7% de los aislamientos manifestaron las colonias de forma y 33.33% circular, a excepción del TA4 en donde el 100% de las colonias presentaron forma circular (Gráfico 2).

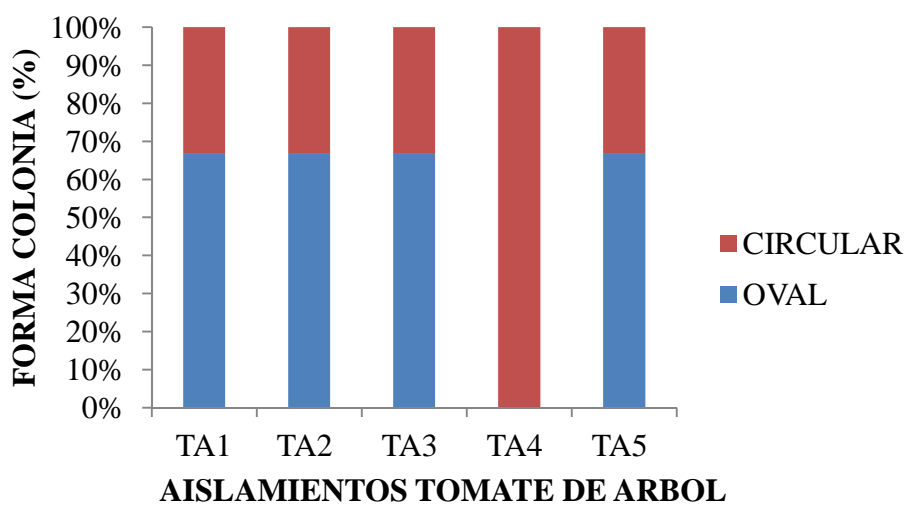


Gráfico No 2 Análisis comparativo de la forma de la colonia para 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis del tomate de árbol.

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.5. FORMA DEL ANILLO CONCÉNTRICO DEL MICELIO DE LOS AISLAMIENTOS DE CHOCHO

En términos generales los mayores porcentajes del anillo concéntrico del micelio en los aislamientos CA1, CA2 Y CA3 fueron para una forma pronunciada, sin embargo, en el aislamiento CA5 el mayor porcentaje correspondió al semipronunciado, por otro lado los aislamientos CA1, CA2 Y CA3 presentaron 30% de anillos no pronunciados. El único tratamiento que manifestó las tres formas (no pronunciado, semipronunciado y pronunciado) fue el CA4 (Gráfico 3).

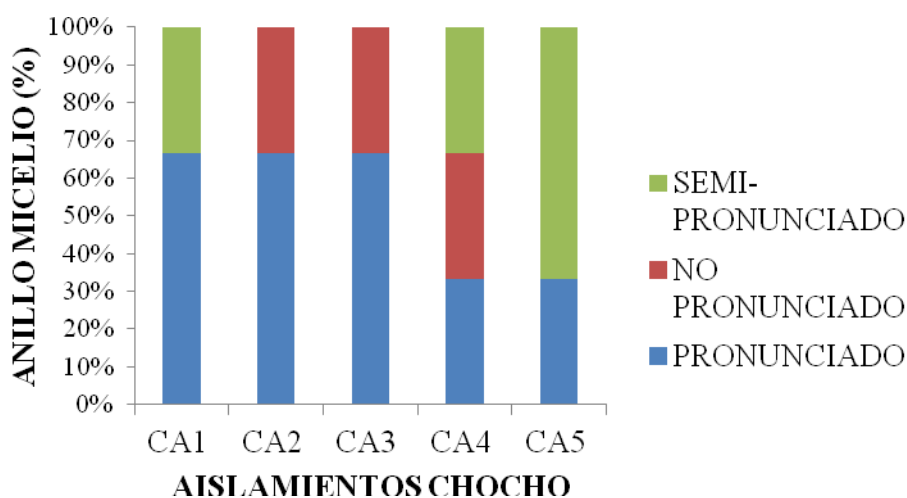


Gráfico No 3 Análisis comparativo del anillo concéntrico del micelio de 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis del chocho.

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.6. FORMA DEL ANILLO CONCÉNTRICO DEL MICELIO DE LOS AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL

Al analizar la forma del anillo concéntrico del micelio de los cinco aislamientos de *C. acutatum* de tomate de árbol se apreció gran variabilidad de

coloraciones. Los aislamientos TA2 Y TA5 tuvieron los mayores promedios para la forma del anillo semipronunciada; sin embargo, en el aislamiento TA1 el 100% correspondió al semipronunciado. El aislamiento TA3 presentó mayor presencia de anillo no pronunciado y el aislamiento TA4 mayor presencia de anillo pronunciado (Gráfico 4).

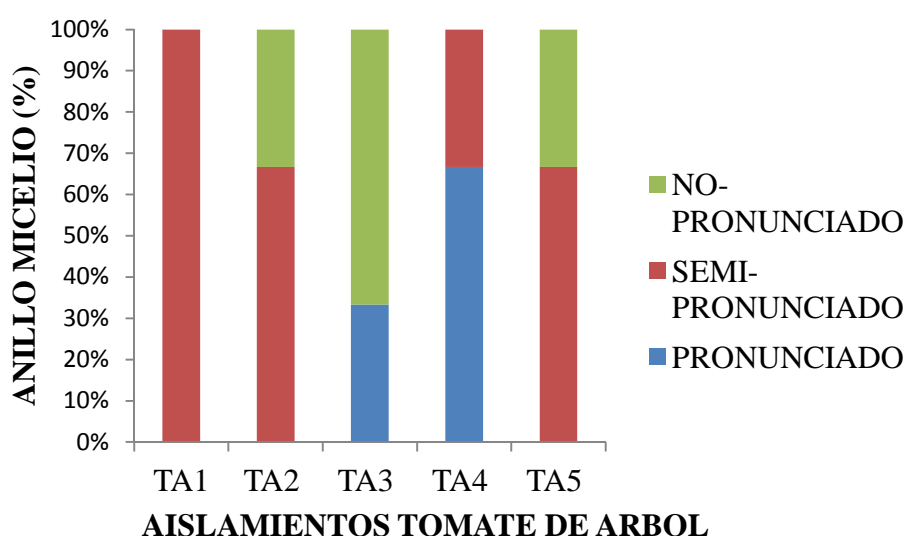


Gráfico No 4 Análisis comparativo del anillo concéntrico del micelio de 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis del tomate de árbol.

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.7. COLOR DE LA COLONIA DE LOS AISLAMIENTOS DE CHOCHO

Al analizar el color de la colonia de cinco aislamientos de *C. acutatum* de chocho se pudo apreciar gran variabilidad de colores. Los aislamientos CA1 y CA5 presentaron mayor coloración verde oliva gris con 66.7% y el resto de la colonia verde oscuro gris con 33.33%, mientras que los aislamientos CA2 y CA3 el 66.7% correspondió a verde oliva gris y los complementos a verde oscuro gris. El CA4 fue el único que presentó el 100% de verde oliva gris (Gráfico 5). Esto indica gran

variabilidad de la colonia de los aislados de *C. acutatum* del chocho, al observarla en el envés de la caja Petri con PDA.

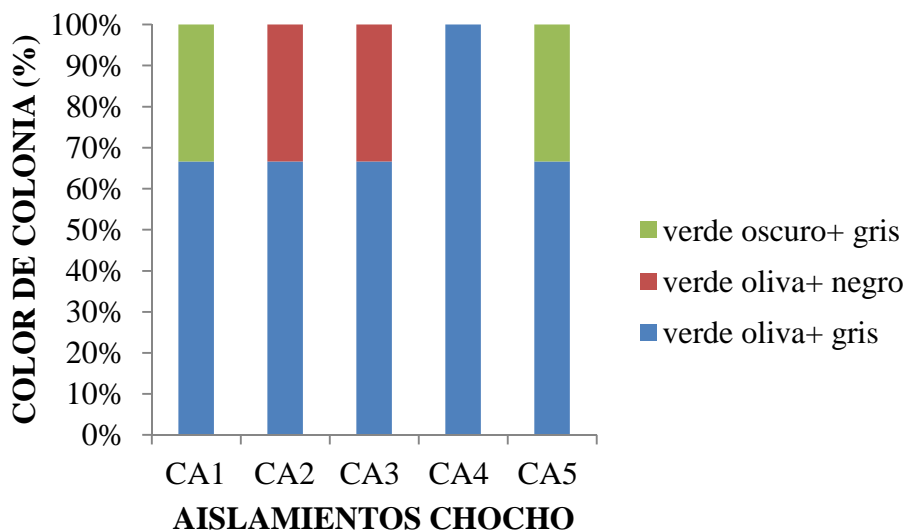


Gráfico No 5 Análisis comparativo del color de la colonia de 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis del chocho.

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.8. COLOR DE LA COLONIA EN LOS AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL

Al analizar el color de la colonia en cinco aislamientos de *C. acutatum* de tomate de árbol se observó que los aislamientos TA1 y TA5 presentaron 66.7 % de coloración anaranjado gris y el 33.33% salmón gris, mientras que los aislamientos TA2 y TA3 obtuvieron un mayor porcentaje para salmón gris y el resto correspondió para anaranjado gris, a excepción del TA4 en donde el 100% del color del haz de colonia fue anaranjado gris (Gráfico 6).

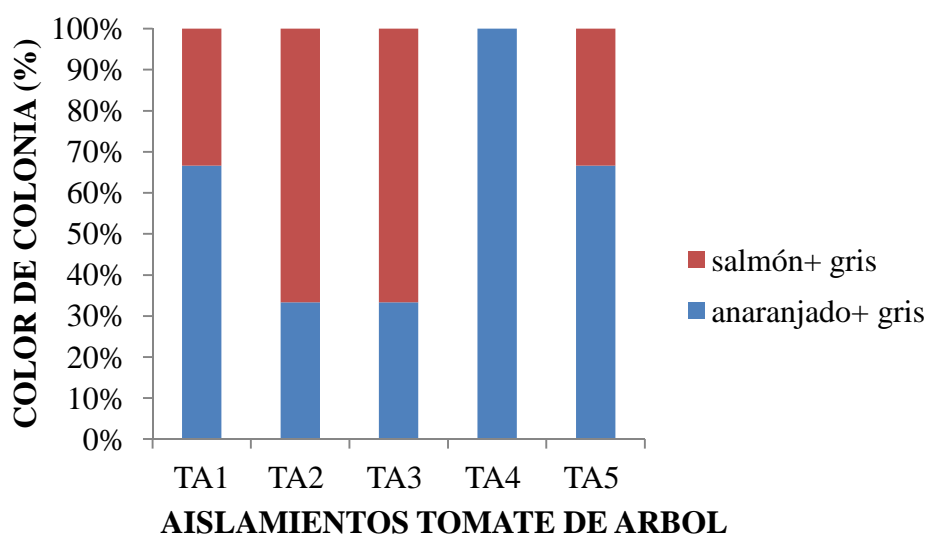


Gráfico No 6 Análisis comparativo del color de la colonia de 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis del tomate de árbol.

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Al analizar el diámetro de la colonia tanto para aislamientos de chocho (Cuadro 2) como para aislamientos de tomate de árbol (Cuadro 4) se observó que en ambos cultivos el tamaño de la colonia no superó los 48 mm de diámetro mayor ni los 45 mm de diámetro menor, luego de 8 días a 25°C de incubación. Este rango coincide con las observaciones realizadas por Talhinhos *et al* (2002), quienes establecieron el tamaño de la colonia en *C. acutatum*. El primer grupo estuvo formado por aislamientos de *Lupinus* spp, aislamientos de referencia de *C. acutatum* y otros hospederos, de crecimiento lento con promedio entre 30.0 a 45.2mm de tamaño de la colonia, y el segundo grupo formado por aislamientos de cítricos y aislamientos de referencia de *C. gloeosporioides*, de crecimiento rápido con un promedio entre 50.2 a 70.3mm de tamaño de la colonia.

En lo referente a forma de la colonia (Gráfico 1 y 2) se pudo apreciar que en su mayoría tanto aislamientos de chocho como de tomate de árbol tuvieron una

forma oval, igualmente en la forma del anillo concéntrico del micelio (Gráfico 3 y 4). Tanto los aislamientos de chocho como de tomate de árbol variaron la forma del anillo concéntrico entre pronunciado a semipronunciado. Estos datos podrían servir como referencia para una precaracterización en próximos estudios considerando la morfología de *C. acutatum*. Según Talhinhos *et al* (2002), los aislamientos de *C. acutatum* presentan diversas coloraciones, densidades y texturas dependiendo de su hospedero, que generalmente varía entre salmón rosado, naranja, carmín, ocre o verde oliva. En cambio los aislamientos de *C. gloeosporioides* presentan coloraciones crema, gris o plomo en sus colonias. En esta investigación el color de la colonia que prevaleció en los aislamientos de chocho (Gráfico 5) fue verde oliva gris, mientras que el color de la colonia en los aislamientos de tomate de árbol (Gráfico 6), varió de anaranjado a salmón.

4.9. TAMAÑO DE LAS CONIDIAS DE LOS AISLAMIENTOS DE CHOCHO

El análisis de varianza para el largo y ancho de las conidias de *C. acutatum* de cinco aislamientos indica diferencias significativas ($p < 0.01$) para el largo, mientras que en el ancho las diferencias significativas fueron ($p < 0.05$) (Cuadro 6).

Los promedios generales fueron: de 15.83 y 6.43 mm para el largo y el ancho de las conidias, respectivamente, con coeficiente de variación de 2.02 y 6.26%, respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro No 6. Análisis de varianza para el largo y ancho de la conidia de 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis del chocho (*L. mutabilis*), IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011

FUENTES DE VARIACIÓN	gl	CONIDIAS (um)	
		LARGO	ANCHO
TOTAL	14		
TRATAMIENTOS	4	0.91 **	0.83 *
ERROR	10	0.10	0.16
X(um)		15.83	6.43
CV(%)		2.02	6.26

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Los aislamientos CA1, CA2 y CA3 presentaron el mayor largo de la conidia en comparación con el aislamiento CA4 que presentó el menor largo de la conidia de *C. acutatum*. Los aislamientos CA2 y CA3 presentaron el mayor ancho de la conidia en comparación con el aislamiento CA4 que presentó el menor ancho de la conidia de *C. acutatum* (Cuadro 7).

Cuadro No 7. Variabilidad en el tamaño de la conidia en 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis en chocho (*L. mutabilis*)

TRATAMIENTOS (AISLAMIENTOS)	CONIDIAS (um)	
	LARGO	ANCHO
CA1	16.33 b	6.53 ab
CA2	16.13 b	6.97 b
CA3	16.13b	6.83 b
CA4	15.00 a	5.70 a
CA5	15.53 ab	6.10 ab

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.10. TAMAÑO DE LA CONIDIA DE LOS AISLAMIENTOS DE TOMATE DE ÁRBOL

Al establecer el análisis de varianza para el largo y ancho de la conidia de 5 aislamientos de *C. acutatum* causante de la antracnosis en el cultivo de tomate de

árbol (*S. betaceum*) se detectaron diferencias significativas ($p < 0.01$) para tratamientos en las dos variables (Cuadro 8).

Los promedios generales fueron de 15.41 y 6.17 mm para el largo y ancho de las conidias, respectivamente, con coeficientes de variación de 1.12% y 3.76%, respectivamente (Cuadro 8).

Cuadro No 8. Análisis de varianza para el largo y ancho de la conidia de 5 aislamientos de *C. acutatum* causante de la antracnosis del tomate de árbol (*S. betaceum*), IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011

FUENTES DE VARIACIÓN	gl	CONIDIAS(um)	
		LARGO	ANCHO
TOTAL	14		
TRATAMIENTOS	4	2.15 **	1.34 **
ERROR	10	0.03	0.05
X(um)		15.41	6.17
CV(%)		1.12	3.76

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

El aislamiento TA4 presentó el menor largo y ancho de las conidias por tanto ocupó el primer lugar del primer rango, mientras que los mayores promedios del largo y ancho correspondieron a los aislamientos TA1 y TA3, respectivamente (Cuadro 9).

Cuadro No 9. Variabilidad en el tamaño de la conidia en 5 aislamientos de *C. acutatum* causa de la antracnosis en tomate de árbol (*S. betaceum*)

TRATAMIENTOS (AISLAMIENTOS)	CONIDIAS(um)	
	LARGO	ANCHO
TA1	16.23 d	6.53 bc
TA2	15.70 c	6.10 b
TA3	15.90 cd	6.97 c
TA4	14.07 a	5.17 a
TA5	15.17 b	6.10 b

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Tanto los aislamientos de chocho como los aislamientos de tomate de árbol registraron conidios de forma ovoide con un lado ahusado y el otro redondeado (Anexos 14 y 15) característico de *C. acutatum*. Talhinhos *et al* (2002), mencionan que el 40-100% de las conidias fueron ahusados en un extremo y redondeadas en el otro para los aislamientos identificados como *C. acutatum*.

En otro estudio descrito por Orozco (2006), se menciona que la raza KLA y PFD, de *C. acutatum* registró una elevada proporción de conidios unicelulares, con un lado fusiforme, mientras que el aislamiento de *C. gloeosporioides*, tuvo conidios unicelulares, cilíndricos con ambos lados redondeados. No hubo diferencias notables en morfología conidial entre aislamientos de la misma raza.

En lo referente al tamaño de la conidia los aislamientos de chocho tuvieron un rango de 15.0 – 16.33 x 5.7- 6.9 um (Cuadro 7), mientras que los aislamientos de tomate de árbol tuvieron un rango de 14.07 – 16.23 x 6.1- 6.9 um (Cuadro 9). Estas medidas se relacionan a las de *C. acutatum* descritos por Rodríguez (2007), quien indica que las masas de conidias de *C. acutatum* son de color rosado a naranja con un tamaño de 8.5 – 16.5 x 4.5- 6 um, mientras el tamaño de las conidias de *C. gloeosporioides* es de 9 – 24 x 3 – 4.5 um.

4.11. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Colletotrichum* spp, MEDIANTE PRIMERS ESPECÍFICOS DE LA ESPECIE CaInt2 y CgInt EN COMBINACIÓN CON ITS4

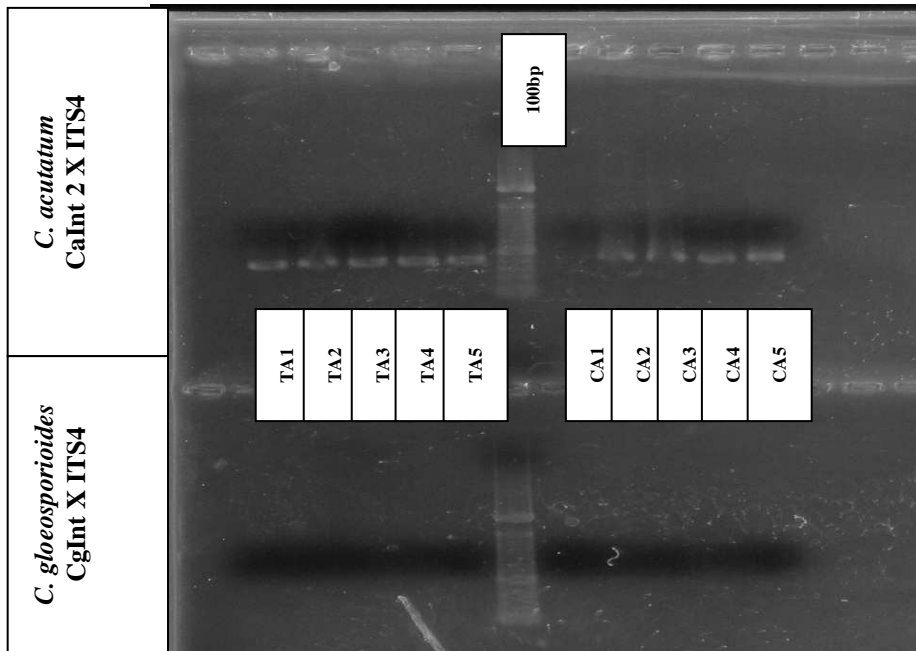


Figura 5. Prueba de diagnóstico de 10 aislamientos de *Colletotrichum* spp (5 de chocho y 5 de tomate de árbol) mediante primers específicos de la especie CaInt2 y CgInt en combinación con ITS4. Marcador molecular 100bp.

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

La prueba de diagnóstico de 10 aislamientos de *Colletotrichum* spp (5 de chocho y 5 tomate de árbol) mediante el uso de primers específicos de la especie como son CaInt2 para *C. acutatum* y CgInt para *C. gloeosporioides* en combinación con ITS4, resultó positivo para CaInt2 (Figura 5) confirmando que el agente causal de la antracnosis en chocho y tomate de árbol es *C. acutatum*.

4.12. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Colletotrichum acutatum*, MEDIANTE SECUENCIAS ITS-PCR

La secuencia nucleótida de ITS1 e ITS4 fue determinada para 10 aislamientos de *Colletotrichum acutatum* (5 de chocho y 5 de tomate de árbol) y comparadas con treinta y dos secuencias de referencia tomadas de Falconí C.E. (2012). Con estas cuarenta y dos secuencias se realizó un análisis filogenético y los resultados se expresan en el gráfico 7.

El análisis filogenético (Gráfico 7) mostró homogeneidad para chocho y homogeneidad para tomate de árbol entre las 10 secuencias ITS- PCR de *C. acutatum* de este estudio con 28 secuencias ITS- PCR de *C. acutatum* de una investigación anterior (Falconí, en prensa). (Los 4 aislamientos de referencia AJ536231 *C. falcatum*, AJ536223 *C. fragariae*, AJ536229 *C. gloeosporioides* y M13906 se encuentran en otros grupos). Los 5 aislamientos de tomate de árbol y los 5 aislamientos de chocho se encuentran formando diferentes subgrupos, indicando una disimilaridad del 0.4% entre ellos. Los 5 aislamientos de tomate de árbol son disimilares en un 0.4% de la secuencia JN543069 de *S. betaceum* y los 5 aislamientos de chocho son disimilares en un 0.7% de las 9 secuencias de *L. mutabilis*, tomadas de Falconí C.E. (2012).

Tomando en cuenta la poca disimilaridad encontrada entre las secuencias ITS- PCR de *C. acutatum* y las secuencias tomadas de Falconí C.E. (2012) se puede decir que los grupos que se formaron en el dendograma (Gráfico 7), indican que el patógeno se adapta al hospedero que infecta, lo que hace posible un rango de

hospederos cruzados entre chocho y tomate de árbol. Orozco (2006), indica que la diversidad genética encontrada entre aislamientos de *Colletotrichum acutatum* puede atribuirse a una respuesta adaptativa a la presión de selección ejercida por el uso de diferentes hospedantes, lo cual selecciona diferentes genotipos del patógeno.

Los aislamientos de referencia en su mayoría tienen como patógeno causante de la enfermedad a *C. acutatum*, a pesar de que estos provienen de distintos hospederos y países. Esto demostraría que *C. acutatum* es extensivamente patogénico en muchos cultivos. Talhinhos *et al* (2002), demostraron que aislados tomados de *Ceanothus* y *Eriobotrya* sp tuvieron como referencia a *C. acutatum*, al igual que otros hospederos CR46 de *Vitis* sp., *Magnolia* sp., y el aislamiento CMG12 de canela. Talhinhos *et al* (2002) sugirieron que la gama de hospederos y epidemiología de los diferentes grupos genéticos dentro de *C. acutatum* debe investigarse más a fondo. *Glomerella acutata*, el teleomorfo de *C. acutatum*, es un potencial recombinante que pueden dar lugar a cepas potencialmente sexuales así como la posterior adaptación a nuevos hospederos.

En el gráfico 7 se puede apreciar que dos aislamientos (AM991131, AM9911379) provenientes de *Olea europea* subsp *europea* tiene como patógeno a *Glomerella acutata*. Esto posibilita el rango amplio de hospederos de *C. acutatum*.

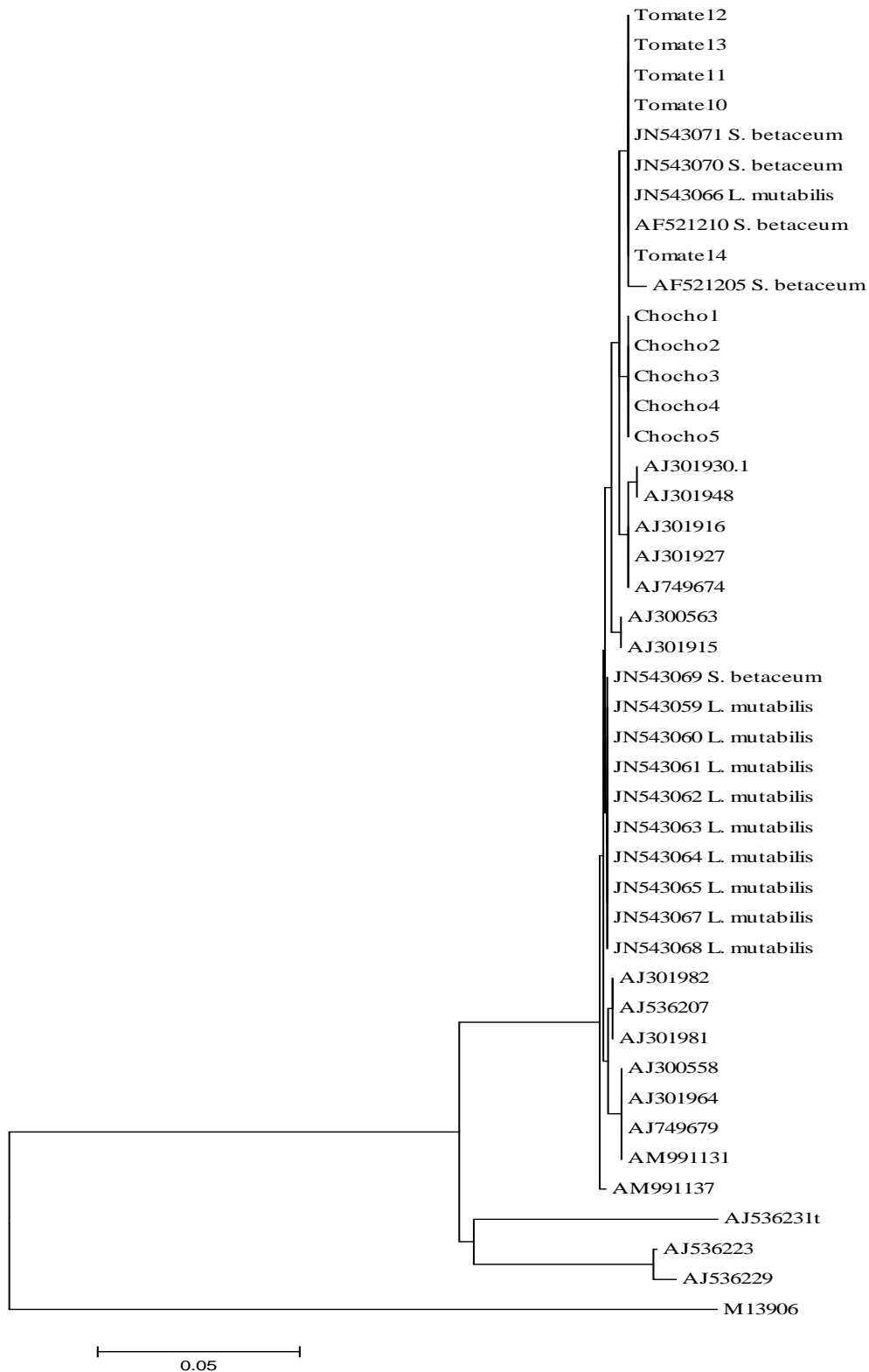


Gráfico 7. Dendrograma de 10 secuencias ITS- PCR de *C. acutatum* (5 de chocho y 5 de tomate de árbol) comparadas con 32 secuencias ITS- PCR de *C. acutatum* tomados de Falconí C.E. (2012).

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.13. INCIDENCIA DE LA ANTRACNOSIS EN EL CULTIVO DE CHOCHO

Al establecer el análisis de varianza para la incidencia de la antracnosis, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para variedades y aislamientos ($p < 0.01$), a excepción de la interacción variedad por aislamiento que no presentó diferencias significativas (Cuadro 10).

El coeficiente de variación y el promedio general fueron de: 35.36% y 73.70% respectivamente (Cuadro 10).

Cuadro No 10. Análisis de varianza para la incidencia de la antracnosis del chocho (*L. mutabilis*), luego de 25 días de la inoculación, IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011

FUENTES DE VARIACIÓN	gl	INCIDENCIA (%)
TOTAL	89	
VARIEDAD	2	2160.60 *
AISLAMIENTOS DE C. <i>acutatum</i>	9	4237.36 **
VARIEDAD X AISLAMIENTO	18	747.65 ns
ERROR	60	679.04
X (%)		73,70
CV (%)		35.36

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

La variedad ECU- 712-1, presentó significativamente ($p < 0.05$) la mayor incidencia de la antracnosis, mientras que la variedad ECU-722-4, exhibió significativamente ($p < 0.05$) la menor incidencia de la antracnosis (Cuadro 11).

Cuadro No 11. Respuesta de 3 variedades de chocho (*L. mutabilis*) sobre la incidencia de la antracnosis (*C. acutatum*), luego de 25 días de la inoculación

VARIETADES	INCIDENCIA (%)
ECU-712-1	81.11 a
F8 (ECU-8415 x ECU-2658)	75.56 ab
ECU-722-4	64.44 b

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Los mayores promedios para la incidencia de la antracnosis en el cultivo de chocho fueron causados por los cinco aislamientos de chocho, mientras que los menores promedios fueron los 5 aislamientos de tomate de árbol. De los cinco aislamientos de chocho el aislamiento Cho2 fue el más agresivo con un 100% de incidencia y el menos agresivo de los cinco aislamientos de tomate de árbol el aislamiento Tom3 con un 37.04% de incidencia de la enfermedad (Cuadro 12).

Cuadro No 12. Efecto de 10 aislamientos de *C. acutatum* sobre la incidencia de la antracnosis del chocho (*L. mutabilis*), luego de 25 días de la inoculación

TRATAMIENTOS (AISLAMIENTOS)	INCIDENCIA (%)
Tom3	37.04 a
Tom5	48.15 ab
Tom4	59.26 abc
Tom2	66.67 bc
Tom1	66.67 bc
Cho3	77.78 cd
Cho5	92.59 d
Cho1	92.59 d
Cho4	96.30 d
Cho2	100.00 d

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.14. SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN EL CULTIVO DE CHOCHO

Al establecer el análisis de varianza para la severidad de la antracnosis, no se encontraron diferencias significativas para variedades ni para la interacción variedad por aislamiento. La variable aislamientos de *C. acutatum* presentó diferencias significativas ($p < 0.01$) (Cuadro 13). Esto indica la mayor o menor virulencia de los aislamientos independientemente del cultivo del chocho en que se inocularon.

El coeficiente de variación y el promedio general fueron de: 34.37% y 2.59 grado x observación respectivamente.

Cuadro No 13. Análisis de varianza para la severidad de la antracnosis del chocho (*L. mutabilis*), luego de 25 días de la inoculación, IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011

FUENTES DE VARIACIÓN	gl	SEVERIDAD (Grado x Observación)
TOTAL	89	
VARIEDAD	2	0.83 ns
AISLAMIENTOS DE <i>C. acutatum</i>	9	14.21 **
VARIEDAD X AISLAMIENTO	18	0.43 ns
ERROR	60	0.79
X (GxO)		2,59
CV (%)		34.37

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Si bien no hubo diferencias significativas para la severidad entre las variedades, todas las variedades fueron susceptibles al ataque de la enfermedad. La variedad ECU-712-1 presentó el mayor grado de severidad (Cuadro 14).

Cuadro No 14. Respuesta de 3 variedades de chocho (*L. mutabilis*) sobre la severidad de la antracnosis, luego de 25 días de la inoculación

VARIETADES	SEVERIDAD (Grado x Observación)
ECU-712-1	2.71
F8 (ECU-8415 x ECU-2658)	2.66
ECU-722-4	2.40

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Los mayores promedios para la severidad de la antracnosis en el cultivo de chocho fueron los cinco aislamientos de chocho, mientras que los menores promedios fueron los 5 aislamientos de tomate de árbol. El más agresivo de los cinco aislamientos de chocho fue el aislamiento Cho2 con un promedio de 5.37 de severidad y el menos agresivo de los cinco aislamientos de tomate de árbol fue Tom3 con un promedio 1.37 de severidad (Cuadro 15).

Cuadro No 15. Efecto de 10 aislamientos de *C. acutatum*, sobre la severidad de la antracnosis luego de 25 días de la inoculación en el chocho (*L. mutabilis*)

TRATAMIENTOS (AISLAMIENTOS)	SEVERIDAD (Grado x Observación)
Tom3	1.37 a
Tom4	1.59 a
Tom2	1.78 ab
Tom5	1.78 ab
Tom1	1.85 ab
Cho3	2.48 b
Cho5	2.48 b
Cho4	3.37 c
Cho1	3.82 c
Cho2	5.37 d

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Datos de las dos variables incidencia (Cuadro 11) y severidad (Cuadro 14) indican que la variedad menos susceptible al ataque de antracnosis fue ECU-722-4. INIAP (2001) evaluó ocho líneas promisorias de chocho (ECU-712, ECU-2716, ECU-2658, ECU-7293, ECU-8415, ECU-722-4, INIAP-ANDINO y línea COTOPAXI), y se registró información de: tolerancia a plagas y tolerancia a enfermedades. Una de las líneas seleccionadas fue ECU-722-4 por obtener la mejor respuesta a estas variables.

Como se puede apreciar en las dos variables incidencia (Cuadro12) y severidad (Cuadro 15) si existe rango de hospederos cruzados. Los aislamientos de tomate de árbol infectaron las plantas de chocho pero con menor severidad. Mientras que los aislamientos de chocho infectaron las plantas de chocho llegando a causar el necrosamiento y muerte del tejido.

Contreras (2006), indica que aislamientos caracterizados como *C. acutatum* mostraron patogenicidad cruzada, así las cepas obtenidas de tomate amarillo y tomate rojo, mostraron síntomas en mango, tomate amarillo y rojo, respectivamente. Además una cepa recuperada de tomate rojo produjo síntomas en granadilla, lulo, mango y tomate amarillo.

4.15. INCIDENCIA DE LA ANTRACNOSIS EN EL CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL

Al establecer el análisis de varianza para la incidencia de la antracnosis, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) para variedades y aislamientos (Cuadro 16).

El coeficiente de variación y el promedio general fueron de: 33.62% y 79.2%, respectivamente (Cuadro 16).

Cuadro No 16. Análisis de varianza para la incidencia de la antracnosis del tomate de árbol (*S. betaceum*), luego de 25 días de la inoculación, IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011

FUENTES DE VARIACIÓN	gl	INCIDENCIA (%)
TOTAL	59	
VARIEDAD	1	12041.67 **
AISLAMIENTOS DE C. <i>acutatum</i>	9	3078.70 **
VARIEDAD X AISLAMIENTO	9	930.56 ns
ERROR	40	708.33
X (%)		79.2
CV (%)		33.62

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

La variedad Gigante común, presentó la mayor incidencia de antracnosis mientras que la variedad Común, presentó la menor incidencia de la antracnosis (Cuadro 17).

Cuadro No 17. Respuesta de 2 variedades de tomate de árbol (*S. betaceum*), sobre la incidencia de la antracnosis, luego de 25 días de la inoculación

VARIETADES	INCIDENCIA (%)
Común	65.00 a
Gigante común	93.33 b

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Los aislamientos de chocho y tomate de árbol causaron infección en sus propios hospederos, además mostraron rango cruzado de hospederos. Tanto los aislamientos de tomate de árbol como los aislamientos de chocho infectaron al cultivo de tomate de árbol. Los mayores promedios de infección se obtuvieron con los aislamientos Tom3, Cho1 y Cho2 con un 100% de incidencia, mientras que el promedio significativamente menor ($p < 0.01$) se obtuvo con el aislamiento Cho4 con un 33.33% de incidencia (Cuadro 18).

Cuadro No 18. Respuesta de 10 aislamientos de *C. acutatum* sobre el desarrollo de antracnosis en el tomate de árbol (*S. betaceum*), luego de 25 días de la inoculación

TRATAMIENTOS (AISLAMIENTOS)	INCIDENCIA (%)
Cho4	33.33 a
Cho5	50.00 ab
Tom5	66.67 bc
Tom2	83.33 cd
Tom4	83.33 cd
Cho3	83.33 cd
Tom1	91.67 cd
Cho2	100.00 d
Cho1	100.00 d
Tom3	100.00 d

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

4.16. SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN EL CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL

Al establecer el análisis de varianza para la severidad de la antracnosis, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para variedades y aislamientos de *C. acutatum* (Cuadro 19).

El coeficiente de variación y el promedio general fueron de: 31.08% y 1.4 grado x observación respectivamente (Cuadro 19).

Cuadro No 19. Análisis de varianza para la severidad de la antracnosis en el cultivo de tomate de árbol (*S. betaceum*), luego de 25 días de la inoculación. IASA Sangolquí-Pichincha 2010-2011

FUENTES DE VARIACIÓN	gl	SEVERIDAD (Grado x Observación)
TOTAL	59	
VARIEDAD	1	1.24 *
AISLAMIENTOS DE <i>C. acutatum</i>	9	0.49 *
VARIEDAD X AISLAMIENTO	9	0.05 ns
ERROR	40	0.18
X (GxO)		1.4
CV (%)		31.08

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

La variedad gigante común es significativamente ($p < 0.05$) más susceptible a la antracnosis que la variedad común (Cuadro 20).

Cuadro No 20. Respuesta de 2 variedades de tomate de árbol (*S. betaceum*), a la severidad de la antracnosis, luego de 25 días de la inoculación

VARIETADES	SEVERIDAD (Grado x Observación)
Común	1.23 a
Gigante común	1.52 b

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

Los aislamientos de chocho y tomate de árbol causaron infección en sus propios hospederos y adicionalmente mostraron un rango cruzado de hospederos. Tanto los aislamientos de tomate de árbol como los aislamientos de chocho infectaron al cultivo de tomate de árbol. El mayor promedio de infección se obtuvo con el aislamiento Tom3 con un promedio de 1.83 de severidad, mientras que el promedio significativamente menor ($p < 0.05$) se obtuvo con el aislamiento Cho4 con un promedio 0.89 de severidad (Cuadro 21).

Cuadro No 21. Respuesta de 10 aislamientos de *C. acutatum* sobre el desarrollo de antracnosis en el tomate de árbol (*S. betaceum*), luego de 25 días de la inoculación

TRATAMIENTOS (AISLAMIENTOS)	SEVERIDAD (Grado x Observación)
Cho4	0.89 a
Cho5	1.00 ab
Tom4	1.28 abc
Tom5	1.28 abc
Cho3	1.33 abc
Cho1	1.44 bcd
Tom1	1.50 bcd
Cho2	1.61 cd
Tom2	1.61 cd
Tom3	1.83 d

Fuente: Pinto y Tiaguaro, 2012

A pesar de que no existe un estudio en el Ecuador sobre el comportamiento de los principales ecotipos de tomate de árbol (*S. betaceum*), al ataque de la antracnosis, se puede apreciar que este estudio mostró que la variedad común tuvo menor incidencia (cuadro 17) y severidad (cuadro 20). Un estudio realizado por INIAP (2004), sobre la determinación del comportamiento de los principales ecotipos comerciales (común, gigante amarillo y gigante mora) de tomate de árbol (*S. betaceum*), al ataque del agente causal de la mancha negra del tronco (*Fusarium solani*; *Phytophthora infestans*), indica que el ecotipo común, presenta el menor tamaño de lesión luego de 60 días de la inoculación, mostrando menor susceptibilidad al ataque de *Fusarium solani*.

Al analizar las dos variables en estudio incidencia (Cuadro 18) y severidad (Cuadro 21), se observa que existe rango de hospederos, como menciona Falconí (2012) los aislamientos de *C. acutatum* obtenidos de plantas de chocho fueron patogénicos al inocular a frutos tomate de árbol y viceversa.

Al observar el cuadro 21 se aprecia que los valores de severidad según la escala propuesta para el análisis de esta variable, son relativamente bajos, lo que demostraría que la enfermedad no proliferó a los 25 días. Según Martínez *et al* (2009), al inocular frutos de tomate de árbol con cepas del mismo cultivo se obtuvo una respuesta de infección media a los 30 días de su evaluación, lo que indica que las plantas debieron ser monitoreadas por un lapso más largo de tiempo.

Según Botero (1999), la antracnosis en el tomate de árbol ataca frutos en cualquier estado de desarrollo. Los síntomas se manifiestan con mayor frecuencia en

el ápice o en los puntos en que varios frutos de un mismo racimo quedan en contacto. En esta investigación este factor pudo ser una limitante en la proliferación de la enfermedad, ya que la inoculación fue hecha en los tallos para observar si el patógeno podría ser agresivo en otras partes de la planta.

V. CONCLUSIONES

- Al caracterizar morfológicamente los cinco aislamientos de chocho como los cinco aislamientos de tomate de árbol los resultados obtenidos para las variables tamaño y color de la colonia como tamaño y forma de la conidia fueron característicos de *C. acutatum*.
- Al caracterizar molecularmente a *Colletotrichum* spp mediante secuencias ITS1- ITS4 conjuntamente con primers específicos de la especie (CaInt2 y CgInt) en combinación con ITS4, en concordancia con recientes estudios de Falconí (2012), los resultados indican que *C. acutatum* es el causante de la antracnosis en chocho y tomate de árbol en el Ecuador.
- Los 5 aislamientos de tomate de árbol y los 5 aislamientos de chocho formaron diferentes subgrupos en el dendograma, indicando una disimilaridad del 0.4% entre ellos, lo cual indica que los subgrupos, se formaron porque el patógeno se adapta al hospedero que infecta.
- En las pruebas de patogenicidad existió rango de hospederos cruzados entre chocho, tomate de árbol y viceversa.
- Las tres variedades de chocho ECU-712-1, F8 (8415 x 2658), ECU- 722-4 fueron susceptibles al ataque de antracnosis. La variedad que obtuvo menos susceptibilidad fue ECU- 722-4.

- De las dos variedades de tomate de árbol Común y Gigante común la menos susceptible al ataque de la antracnosis fue la variedad Común.
- A pesar de que las muestras fueron tomadas de distintas localidades de la serranía ecuatoriana se puede observar que tanto los aislamientos de chocho como de tomate de árbol se encuentran subgrupo cercanos, lo que indica que las poblaciones de *C. acutatum* en el Ecuador son clonales en chocho y clonales en tomate de árbol.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con estudios de caracterización molecular de *C. acutatum* en chocho y tomate de árbol evaluando diferentes razas o biotipos de este patógeno que podrían existir en el Ecuador, ya que aclararía el comportamiento patológico y morfológico de *C. acutatum* en distintos hospedantes.
- Se recomienda usar la variedad ECU- 722-4 para chocho y la variedad Común para tomate de árbol para continuar con futuros estudios teniendo certeza de encontrar plantas individuales con potencial de genes de tolerancia a la antracnosis.

VII. BIBLIOGRAFIA

Afanador, K; Minz, D; Maymon; Freeman, S. 2002. Characterization of *Colletotrichum* Isolates from Tamarillo, Passiflora and Mango in Colombia and Identification of a Unique Species from the Genus. Phytopathology, 93: 579-587.

Alarcón, J; Chavarriaga, W. 2007. Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (penz) penz & sacc. En tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. (En línea). Consultado el 17 de septiembre de 2010. Disponible en:

[http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/agronomia15\(1\)_6.pdf](http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/agronomia15(1)_6.pdf)

AMGEN. Biotecnología para la Salud. 2010. (En línea) Consultado el 30 de Noviembre de 2009. Disponible en:

<http://biotec.amgen.es/html/reaccion.html>

Anangón, B. 2007. Estudio de factibilidad para la formación de un centro de acopio para la exportación de tomate de árbol al mercado español. (En línea). Consultado el 3 de octubre del 2011. Disponible en:

<http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/576/1/CD-1088.pdf>

Botero, M. 1999. Estudios biológicos y epidemiológicos de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en tomate de árbol y desarrollo de alternativas para su manejo integrado en Colombia. (En línea). Consultado 16 de octubre de 2010. Disponible en:

http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061127162055_Interaccion%20microorganismo%20antracnosis%20tomate%20de%20arbol.pdf

Calvo, I. 2009. Cultivo de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) Área: Manejo integrado de cultivos / frutales de altura. (En línea). San José, Costa Rica. Consultado el 14 de octubre de 2010. Disponible en:

<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00168.pdf>

Contreras, C. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense*), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), granadilla (*Passiflora ligulari* Juss), mango (*Manguifera indica*) y tallos de mora (*Rubus glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. (En línea). Consultado 10 de diciembre de 2010. Disponible en:

www.corpoica.org.co/sitioweb/.../memoriaseminariofrutastropicales.pdf

Contreras, C. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp obtenidos de frutos de lulo, tomate de árbol, granadilla y tallos de mora con síntomas de antracnosis. Dirección de planificación Gobierno de la provincial de Pichincha. 2005. (En línea). Consultado el 8 de Diciembre de 2009. Disponible en: http://www.zonu.com/ecuador_mapas/Mapa_Provincia_Cotopaxi_Ecuador.htm

E –CIENCIA. 2009. Revista de divulgación científica de la Escuela Politécnica del Ejército ¿Cómo serán los alimentos del futuro? (En línea). Sangolquí, EC. Consultado el 20 de septiembre de 2010. Disponible en: [eciencia revista@gmail.com](mailto:ciencia revista@gmail.com)

Eguiarte, L; *et al.* 2007. Ecología molecular. México. (En línea). Consultado el 12 de mayo de 2011. Disponible en: http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/dinamica_de_poblaciones/gente_dinapo/b/meli/papers_pdf/libro_ecologia_molecular.pdf

Falconí, CE. (2012). Morphological, pathological, and molecular characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupin (*Lupinus mutabilis*) and its relationship with anthracnose of tamarillo in the Ecuadorian Andes. In: *Lupinus mutabilis* in Ecuador with especial emphases on anthracnose resistance, Chapter two of Cesar Falconi's PhD Thesis, Plant Breeding Laboratory, Wageningen University – The Netherlands.

Falconí CE. (2012). Comparison of three inoculation techniques in five phenological stages, with three *Colletotrichum* isolates to determine moderate level of resistance to this fungus in Andean lupin (*Lupinus mutabilis* S.) under greenhouse conditions. In: *Lupinus mutabilis* in Ecuador with especial emphases on anthracnose resistance, Chapter five of Cesar Falconi's PhD Thesis, Plant Breeding Laboratory, Wageningen University – The Netherlands.

FAO. 2000. Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. (En línea). Santiago, Chile. Consultado 20 de octubre de 2010. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro10/home10.htm>

García, E; Lozoya, G. 2004. Genes de resistencia a enfermedades en plantas. (En línea). Obregón, Mexico. Consultado 2 de diciembre de 2010. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/612/61222315.pdf>

INIAP, 2001. Evaluación agronómica y selección de 8 líneas promisorias de chocho en 5 localidades. (En línea). Ecuador. Consultado 7 de Octubre del 2011. Disponible en:

<http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=PADIPR.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=005178>

INIAP, 2004. Determinación del comportamiento de los principales ecotipos comerciales de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) al ataque del agente causal de la mancha negra del tronco. (En línea). Ecuador. Consultado 7 de Octubre del 2011. Disponible en:

<http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=PADIPR.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=005877>

Jacobsen, S; Mujica, A. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. (En línea). Consultado 23 de octubre de 2010. Disponible en: <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR30515.pdf>

Jacobsen, S; Sherwood, S. 2002. Cultivo de granos andinos en Ecuador informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. (En línea). Consultado 1 de noviembre de 2010. Disponible en:

<http://www.infoagro.net/shared/docs/a5/cproandinos4.PDF>

Junovich, A. 2003. El cultivo de chocho a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario. Proyecto SICA- Banco Mundial. (En línea). Consultado el 8 de Diciembre de 2009. Disponible en:

<http://www.magap.gov.ec/magapweb/BIBLIOTECA/AGRONEGOCIOS/PRODUCTOS%20PARA%20INVERTIR%20-LEGUMINOSAS/chocho.pdf>

La Granja. 2010. Control biológico de la Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. y Sacc.) en Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante hongos endófitos antagonistas. (En línea). Paute, EC. Consultado el 17 de septiembre de 2010. Disponible en:

<http://mail.ups.edu.ec/lagranja/publicaciones/lagranja/contenidospdf//biologico11.pdf>

Madariaga, R.2008. Enfermedades del canola, lupino y arveja en santa bárbara, precordillera, y cañete, secano costero, en los ciclos agrícolas. (En línea). Consultado 1 de noviembre de 2010. Disponible en:

<http://www.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR36484.pdf>

Martinez P., Barrio E., Garcia D., Querol A. 2000. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal región. FEMS Microbiology Letters 189: 97-101

Martínez, E; *et al.* 2009. Identificación de las especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en lima Tahití, tomate de árbol y mango. (En línea). Colombia. Consultado 12 de Octubre del 2011. Disponible en:

<http://www.agronomia.unal.edu.co/adjuntos/investigacion/revista/272/v27n2a09.pdf>

Mera, M. 2003. Nuevas variedades australianas de lupino probadas en Chile. Tierra adentro. (En línea). Consultado el 01 de diciembre del 2010. Disponible en:

<http://www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR30515.pdf>

Ministerio de Agronomía y Ganadería. 1999. (En línea). Consultado el 14 de diciembre de 2009. Disponible en:

http://www.sica.gov.ec/agronegocios/nuevas%20agroexportaciones/sup_pro_ren.htm

Nirenberg H., Freiler U., and Hagedorn G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. The Mycological Society of America. *Mycologia*. 94: 307-320.

Orozco, M. 2006. Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de *C. acutatum* Simmonds de cítricos en México. (En línea). México. Consultado 12 de Octubre del 2011. Disponible en:

http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Mario_Orozco_Sanchez.pdf

Pilco, J. 2009. Evaluación de dos formulaciones químicas a base de N- P- K para el crecimiento y desarrollo del tomate de árbol (*Solanum betaceum*). (En línea). Riobamba, EC. Consultado el 14 de octubre de 2010. Disponible en:

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/346/1/13T0640PILCO%20JAIME.pdf>

Ramírez, N. 2008. Optimización del proceso de elaboración de pulpa de tomate de árbol (*solanum betaceum* Cav), maximizando la retención de ácido ascórbico. (En línea). Loja, EC. Consultado el 30 de septiembre de 2010. Disponible en:

<http://repositorio.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/3263/1/660X1098.pdf>

Riegel, R; *et al.* 2008. Virulence analysis of different haplotypes of *Colletotrichum lupini* isolates from southern chile. (En línea). Consultado el 17 de noviembre del 2010. Disponible en:

<http://www.agrarias.uach.cl/escuela/graduados/pdf/PresentacionesCongresos/ManuelMu%C3%B1oz/virulence%20analysis%202008.pdf>

Rodríguez, A. 2007. Caracterización Molecular en poblaciones de *Colletotrichum* spp. Asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. (En línea). Consultado el 2 de diciembre del 2010. Disponible en:

<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf>

Rondón, J. 2001. Estudio biológico y epidemiológico de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penz), del tomate de árbol (*Solanum betacea*, (Cav) Sendt), y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia. (En línea). Consultado el 4 de diciembre del 2010. Disponible en:

http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061127103437_Estudio%20de%20la%20antracnosis%20en%20tomate%20de%20arbol.pdf

Rueda, *et al.* 2005. Perfil químico y microbiológico del tomate de árbol (*Cyphomandra* spp.) y su papel contra *Colletotrichum gloeosporioides* Penz agente causal de la antracnosis. (En línea). Consultado 4 de diciembre de 2010. Disponible en:

www.globalwebs.org/actubiol/.../suplemento.html

Sandoval, C. 2004. Manual Técnico Manejo integrado de Enfermedades en cultivos hidropónicos. (En línea). Consultado el 21 de septiembre de 2010. Disponible en:

<http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/aup/pdf/integral.pdf>

Studdert, G. 2006. Rotaciones de cultivos en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina): una herramienta para el manejo de la dinámica del nitrógeno y del carbono en el suelo. (En línea). Consultado 8 de diciembre de 2010. Disponible en:

http://www.kriptia.com/CIENCIAS_AGRARIAS/AGRONOMIA/COMPORTAMIENTO_DEL_SUELO_EN_CULTIVOS_ROTATORIOS

Souza, T. 2001. Métodos de inoculação de *Colletotrichum fragariae* em morangueiro. Publication Scientia Agricola, 58: 725-729.

Talhintas,P; Sreennivasaprasad, S; Neves, J; Oliveira,H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. (En línea). Consultado 15 de octubre de 2010. Disponible en:

<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2002.92.9.986>

Tierra Adentro. 2003. Nuevas variedades australianas de lupino probadas en Chile. (En línea). Consultado 20 de octubre de 2010. Disponible en:

<http://www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR30515.pdf>

Vallejos, E; Silva, P y Acevedo, E. 2003. Evaluación del rendimiento de nueve genotipos de lupino en la zona central. (En línea). Consultado 4 de diciembre de 2010. Disponible en:

www.sap.uchile.cl/.../Evaluación_del_Rendimiento_de_Nueve_Genotipos_de_Lupino_en~1.pdf

White, T; Bruns, S y Taylor, W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. y White, T. (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press: 315-322.