



Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad de la antracnosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

Chacón Ibarra, Josselyn Lizbeth

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier PhD

22 de febrero del 2022



JChacon Tesis ESPE 2022.txt

Scanned on: 20:18 February 24, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	353
Words with Minor Changes	47
Paraphrased Words	444
Omitted Words	0





DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, “**Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad de la antracnosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.)**” fue realizado por la señorita **Chacón Ibarra Josselyn Lizbeth** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 2 de marzo de 2022



Flores Flor, Francisco Javier PhD.

C. C. 1713443479



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Chacón Ibarra Josselyn Lizbeth**, con cédula de ciudadanía n°1727069336, declaro/declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad de la antracnosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.)** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 2 de marzo de 2022

Chacón Ibarra, Josselyn Lizbeth

C. C. 1727069336



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Chacón Ibarra Josselyn Lizbeth**, con cédula de ciudadanía n°1727069336, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad de la antracnosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.)** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 2 de marzo de 2022

Chacón Ibarra, Josselyn Lizbeth

C. C. 1727069336

Dedicatoria

A mis abuelitos, Panchito y Flory, que partieron inesperadamente pero se fueron creyendo ciegamente en mí. Gracias por darme toda la fuerza para no rendirme. Este trabajo va dedicado en honor a su memoria.

A mi familia, mis padres Marco y Patricia, y mi hermano Alex, por su amor incondicional y paciencia a lo largo de todos estos años, gracias a ustedes he logrado ser una mejor persona. Son un verdadero ejemplo de trabajo arduo y serán siempre un gran apoyo para mí.

Agradecimientos

A mi tutor del Proyecto de Unificación Curricular, Dr. Francisco Flores del Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por su paciencia y por todas las sugerencias que me ha brindado para desarrollar este trabajo.

Al Dr. José Ochoa, Dra María Luisa Insuasti e Ing. Geoconda Cañizares del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal – INIAP y al Ing. Francisco Garrido e Ing. Vanessa Gaona del Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen por permitirme ser parte de su espacio de trabajo y facilitarme del material y equipo necesario, además de todo el tiempo que dedicaron en orientarme y aconsejarme para realizar con éxito este trabajo de investigación.

A mis padres y a mi hermano, quienes han sido mi soporte a lo largo de mi carrera y han apoyado cada decisión que he tomado con respecto a mi vida profesional.

A todos mis amigos y amigas que han estado para mí en los buenos y malos momentos. Andy, Sofi y Jair gracias por seguir aquí y por brindarme siempre sus mejores consejos.

Índice de contenido

Carátula.....	1
Reporte del análisis de Copyleaks.....	2
Certificación docente	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenido	8
Índice de tablas	12
Índice figuras	13
Listado de abreviaturas	15
Resumen.....	16
Abstract	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Planteamiento de problema	18
Justificación del problema.....	18
Objetivos.....	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos.....	20
Hipótesis.....	21
Capítulo II: Marco Teórico	22
Cultivo de naranjilla.....	22
Origen y distribución.....	22

Taxonomía	22
Variedades	23
Características botánicas y genéticas	24
Condiciones ambientales del cultivo	25
Importancia económica del cultivo en Ecuador	25
Enfermedades fúngicas en <i>Solanum quitoense</i> Lam.	27
Antracnosis	28
Agente causal de la antracnosis	29
Proceso de infección del agente causal de la antracnosis	30
Complejo de especies de <i>Colletotrichum</i>	30
Métodos de identificación del agente causal de la antracnosis	32
Caracterización morfológica (macro y microscópica)	32
Conidios de <i>Colletotrichum</i>	33
Apresorios de <i>Colletotrichum</i>	34
Caracterización molecular.....	34
Marcadores moleculares	35
Gen del Espaciador Transcrito Interno (ITS)	35
Gen de actina (ACT).....	36
Postulados de Koch	36
Capítulo III: Metodología	38
Áreas de investigación y recolección del material vegetal.....	38
Aislamiento y purificación del hongo	39
Aislamiento primario	39
Aislamiento secundario (purificación)	39

	10
Caracterización morfológica.....	40
Identificación macroscópica.....	40
Identificación microscópica.....	40
Caracterización molecular.....	40
Extracción del ADN fúngico	40
Amplificación por PCR y secuenciación.....	41
Análisis filogenético	42
Postulados de Koch	43
Capítulo IV: Resultados.....	45
Recolección de los frutos	45
Caracterización morfológica.....	45
Evaluación macroscópica de los aislados monospóricos.....	45
Evaluación microscópica de los aislados monospóricos.....	50
Caracterización molecular.....	53
Extracción del ADN fúngico	53
Amplificación por PCR y secuenciación.....	53
Análisis Blast.....	54
Análisis filogenético.....	56
Postulados de Koch (Test de patogenicidad).....	59
Capítulo V: Discusión	68
Recolección de los frutos	68
Caracterización morfológica.....	69
Evaluación macroscópica de los aislados monospóricos.....	69

Evaluación microscópica de los aislados monospóricos.....	70
Caracterización molecular.....	72
Postulados de Koch.....	74
Capítulo VI: Conclusiones	76
Capítulo VII: Recomendaciones	78
Capítulo VIII: Referencias.....	79
Anexos	87

Índice de tablas

Tabla 1 Superficie, producción y rendimiento del cultivo de naranjilla en Ecuador	
Superficie, producción y rendimiento del cultivo de naranjilla en Ecuador	26
Tabla 2 Enfermedades fúngicas en el cultivo de <i>Solanum quitoense</i> Lam.....	27
Tabla 3 Coordenadas geográficas de los frutos de <i>Solanum quitoense</i> Lam. con antracnosis.....	38
Tabla 4 Primers utilizados en la amplificación de PCR	42
Tabla 5 Características macroscópicas de los aislados del agente causante de los síntomas de la antracnosis en frutos de <i>Solanum quitoense</i> de diferentes zonas del Ecuador.....	46
Tabla 6 Tamaño y forma de los conidios de los aislados del agente causante de los síntomas de la antracnosis en frutos de <i>Solanum quitoense</i> de diferentes zonas del Ecuador.....	52
Tabla 7 Valores de concentraciones y pureza de las muestras de ADN de los aislados de <i>Colletotrichum</i>	53
Tabla 8 Postulados de Koch: número de síntomas y signos de la antracnosis en frutos maduros e inmaduros de naranjilla tras inoculación de <i>Colletotrichum</i> sp.	61
Tabla 9 Diámetros de las lesiones de color marrón de los frutos inmaduros de naranjilla infectados con los aislados del estudio.....	62
Tabla 10 ANOVA de los diámetros de lesión en los frutos inmaduros de naranjilla infectados con los aislados de <i>Colletotrichum</i> sp.	62
Tabla 11 Evaluación de la patogenicidad de los cinco aislados de <i>Colletotrichum</i> sp. a partir de la prueba de Tuckey	63

Índice figuras

Figura 1 Síntomas comunes de la antracnosis en frutos de naranjilla obtenidos de Pichincha, Santo Domingo y Tungurahua.....	45
Figura 2 Aislado T1-Pi correspondiente al agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4, 8 y 13 días de crecimiento	47
Figura 3 Aislado T2-Pi correspondiente al agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4, 8 y 13 días de crecimiento	48
Figura 4 Aislado NM-SD correspondiente al agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4, 8 y 13 días de crecimiento	48
Figura 5 Aislado RV-Tu correspondiente al agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4 y 8 días de crecimiento	49
Figura 6 Aislado RN-Tu correspondiente al agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4, 8 y 13 días de crecimiento	49
Figura 7 Imagen microscópica de los conidios de los aislados del agente causal de los síntomas de la antracnosis en frutos de <i>Solanum quitoense</i> de diferentes zonas del Ecuador.	50
Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa 4% de los amplicones de ITS y ACT de las muestras de ADN de los aislados de <i>Colletotrichum</i>	54
Figura 9 Árbol filogenético multilocus (ITS y ACT) obtenido a partir del método de máxima verosimilitud	58
Figura 10 Frutos sanos de <i>Solanum quitoense</i> Lam. var <i>quitoense</i> el día 0 de la inoculación con los aislados de <i>Colletotrichum</i>	59
Figura 11 Frutos de <i>Solanum quitoense</i> Lam. var <i>quitoense</i> el día 7 de la inoculación con los aislados de <i>Colletotrichum</i>	60
Figura 13 Postulados de Koch: reaislado de T1-Pi de frutos de naranjilla inmaduros	64

Figura 14 Postulados de Koch: reaislado de T2-Pi de frutos de naranjilla	
inmaduros	65
Figura 15 Postulados de Koch: reaislado de NM-SD de frutos de naranjilla	
inmaduros	65
Figura 16 Postulados de Koch: reaislado de RN-Tu de frutos de naranjilla	
inmaduros	66
Figura 17 Postulados de Koch: reaislado de RN-Tu de frutos de naranjilla	
inmaduros	67

Listado de abreviaturas

ITS: espaciador transcrito interno

ACT: actina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

TUB2: beta-tubulina

CHS-1: quitina sintasa 1

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HIS3: histona3

CAL: calmodulina

GS: glutamina sintetasa (GS)

PDAa: agar papa dextrosa acidificado

MLSA: análisis filogenético molecular multilocus

Resumen

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) es un frutal originario de las estribaciones de la cordillera de los Andes y de la zona subtropical de Ecuador y Colombia. Los cultivos de este frutal andino se han visto afectados por la antracnosis, enfermedad causada por hongos del género *Colletotrichum*. Este proyecto tiene como objetivo caracterizar a nivel morfológico y molecular al agente causal de la enfermedad de la antracnosis en plantas sintomáticas de naranjilla de Pichincha, Santo Domingo y Tungurahua. A partir de la amplificación y secuenciación de dos marcadores fúngicos, espaciador transcrito interno (ITS) y actina (ACT), se realizó un análisis filogenético MLSA en el que se comprobó que todos los aislados pertenecen al complejo de *Colletotrichum acutatum*, sin embargo no se lograron identificar a nivel de especie. Los resultados de la caracterización molecular son respaldados por las observaciones macro y microscópicas, donde se identificaron colonias de diferentes tonalidades de gris, tales como gris verdoso y anaranjado grisáceo, con conidios cilíndricos y fusiformes con ambos extremos agudos o un solo extremo agudo, características propias de las especies del complejo *C. acutatum*. Los postulados de Koch permitieron confirmar que las cepas de *Colletotrichum* sp. aisladas originalmente correspondían al agente causal de la antracnosis. Este proyecto es un importante aporte para el conocimiento sobre el hongo causante de la antracnosis en naranjilla, y podrá ser utilizado para tomar medidas preventivas enfocadas en un mejor control del microorganismo en el país.

Palabras clave:

- **ANTRACNOSIS**
- **HONGOS DEL GÉNERO *Colletotrichum***
- **ESPACIADOR TRANSCRITO INTERNO (ITS)**
- **ACTINA (ACT)**

Abstract

Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) is a fruit tree native to the foothills of the Andes and the subtropical zone of Ecuador and Colombia. Crops of this Andean fruit tree have been affected by anthracnose, a disease caused by fungi of the *Colletotrichum* genus. The objective of this project is to characterize at morphological and molecular level the causal agent of anthracnose disease in symptomatic naranjilla plants from Pichincha, Santo Domingo and Tungurahua. Based on the amplification and sequencing of two fungal markers, internal transcribed spacer (ITS) and actin (ACT), an MLSA phylogenetic analysis was carried out in which it was found that all isolates belong to the *Colletotrichum acutatum* complex, however, they could not be identified at the species level. The results of the molecular characterization are supported by macro and microscopic observations, where colonies of different shades of gray were identified, such as greenish gray and grayish orange, with cylindrical and fusiform conidia with both sharp ends or only one sharp end, characteristics of the species of the *C. acutatum* complex. Koch's postulates confirmed that the strains of *Colletotrichum* sp. originally isolated corresponded to the causal agent of anthracnose. This project is an important contribution to the knowledge about the fungus causing anthracnose in naranjilla, and could be used to take preventive measures focused on a better control of the microorganism in the country.

Keywords:

- **ANTHRACNOSE**
- ***Colletotrichum***
- **INTERNAL TRANSCRIPTED SPACER (ITS)**
- **ACTIN (ACT)**

Capítulo I: Introducción

Planteamiento de problema

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) o lulo es un frutal originario de las estribaciones de la cordillera de los Andes y de la zona subtropical de Ecuador y Colombia (Gancel et al. 2008), y su importancia a nivel nacional e internacional radica en el sabor, olor, color y aportes nutricionales de su fruta (INIAP, 2014). En territorio ecuatoriano, se cultiva alrededor de 10.000 ha de naranjilla, siendo una fuente de ingresos importante para algunas de las familias residentes en las provincias de Tungurahua, Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Santo Domingo de los Tsáchilas, Imbabura y Pichincha (Green et al., 2018; INIAP, 2014).

A pesar de las defensas mecánicas naturales de los frutos de naranjilla y del uso de fungicidas, el cultivo de este frutal es susceptible al ataque de plagas y enfermedades, sobre todo aquellas causadas por hongos y virus, como los hongos del género *Colletotrichum* causantes de los síntomas de la antracnosis (Caicedo & Higuera, 2007).

La antracnosis ha llegado a ser una de las más grandes amenazas para el agricultor de naranjilla debido a que afecta la calidad de frutos en diferentes etapas de desarrollo (Caicedo et al., 2017). Los frutos infectados muestran síntomas como lesiones negras acompañadas de masas de esporas de color salmón, lo que significa una disminución del rendimiento del frutal. Por tal motivo, se ha limitado la producción de naranjilla lo que a su vez resulta en la disminución de su valor comercial en el mercado y por tanto en una pérdida económica para los agricultores locales (Dávila et al., 2018).

Justificación del problema

La antracnosis puede ser controlada con el uso de fungicidas, sin embargo el uso excesivo y prolongado induce resistencia en *Colletotrichum*, además que resulta en

un problema para el ambiente y para la salud pública (Caicedo et al. 2017). Than et al. (2008) recomiendan que para formular estrategias de control efectivas contra la enfermedad y que además sean amigables con el ambiente, se debe realizar la identificación del agente causal en primer lugar.

La identificación del agente causal de la antracnosis ha sido complicada debido a que la alta diversidad de especies de los complejos de *Colletotrichum*, por lo que son necesarios más estudios de caracterización además de los análisis de morfología y patogenicidad (Afanador et al., 2002). Las especies del género *Colletotrichum* requieren de mayor atención sobre todo por su gran impacto en la agroindustria debido a su capacidad de infectar un amplio rango de hospederos, reduciendo el rendimiento de un gran número de cultivos en todo el mundo (Da Silva et al., 2020).

A lo largo de los últimos años se han desarrollado investigaciones de caracterización y determinación taxonómica de *Colletotrichum*, basados en los signos del hongo en la fruta, morfología macro y microscópica, y en criterios de preferencia del hongo a ciertos huéspedes (Caicedo et al., 2017). Sin embargo, dichos criterios no resultan lo suficientemente confiables para diferenciar los complejos de especies. Por ello, se ha implementado el uso de herramientas moleculares como: amplificación por PCR con primers específicos de especie, pruebas RAPD y análisis de secuencia de la región del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico (ADNr), útiles para trabajar de la mano con los otros criterios y determinar las especies de *Colletotrichum* (Afanador et al., 2002). Sin embargo, se ha demostrado que la región ITS tiene bajo poder de resolución para identificar y diferenciar las especies del género *Colletotrichum* (Crouch et al., 2009). Es por ello, que actualmente las investigaciones se basan en desarrollar análisis filogenéticos moleculares multilocus, como Caicedo et al. (2017) quienes utilizaron este criterio basado en secuencias combinadas de actina (ACT), β -tubulina (TUB2) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y demostraron que

se podía aclarar la posición taxonómica y filogenética de diferentes aislados de *Colletotrichum*.

El agente causal de los síntomas comunes de la antracnosis es económicamente importante en las zonas productoras de naranjilla, por lo que se deberían desarrollar técnicas de identificación objetivas que permitan una clasificación acertada a partir de datos moleculares de las especies de *Colletotrichum*. El objetivo del proyecto es realizar una caracterización a nivel morfológico y molecular de los aislados de *Colletotrichum* de naranjilla con el fin de aclarar la taxonomía y filogenia de la especie del hongo causante de la antracnosis en el frutal andino.

Los resultados obtenidos en este proyecto son un importante aporte para el conocimiento sobre el hongo causante de la antracnosis en plantas de naranjilla. Esta información podrá ser utilizada para tomar medidas preventivas y para lograr un mejor control del microorganismo en el país.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar a nivel morfológico y molecular el agente causal de la enfermedad de la antracnosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

Objetivos específicos

- Aislar los microorganismos asociados con la sintomatología de la enfermedad de la antracnosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).
- Identificar macro y microscópicamente a los microorganismos aislados a partir de muestras de plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) con sintomatología de la enfermedad de la antracnosis.
- Identificar a nivel molecular a los microorganismos aislados a partir de muestras de plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) con sintomatología de la enfermedad de la antracnosis.

- Completar los postulados de Koch en plantas sanas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

Hipótesis

El fitopatógeno relacionado con las lesiones hundidas de color marrón acompañadas de masas de esporas de color salmón en frutos de naranjilla pertenece al género *Colletotrichum*.

Capítulo II: Marco Teórico

Cultivo de naranjilla

Origen y distribución

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) o lulo es un frutal de 1 a 2.5 metros de altura, originario de las estribaciones de la cordillera de los Andes, específicamente de los bosques húmedos subtropicales de Ecuador y Colombia (Gancel et al. 2008). Dichos países son los principales productores, sin embargo, el cultivo de naranjilla se ha extendido a países como Venezuela, Perú, Panamá, Costa Rica y Guatemala (Gómez et al., 2014).

El Ecuador es un país autosuficiente en la producción de naranjilla, siendo la Amazonía (Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe) la zona más productiva, seguido de las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Imbabura, Pichincha y Tungurahua (INIAP, 2014). Para el 2019, a nivel nacional se utilizaba un total de 2.038,21 hectáreas para el cultivo de 6.749,38 t de naranjilla; siendo Imbabura la provincia con el nivel más alto de rendimiento (12,89 t/ha), mientras que Carchi era la provincia que generaba una mayor producción de naranjilla (3,313 t) (SIPA, 2019).

Taxonomía

Solanum quitoense es una planta arbustiva que pertenece a la familia Solanaceae. Comúnmente se la conoce como lulo en Colombia y Perú, naranjilla en Ecuador y en el resto de países de habla hispana, naranjilla de Quito y naranjilla de Castilla en España y naranjilla o Quito's orange en países de habla inglesa (Rojas, 2017). La taxonomía de la naranjilla es la siguiente:

Dominio: Eucariota

Reino: Plantae

Filo: Espermatofita

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum quitoense*

Variedad: *quitoense* (sin espinas) y *septentrionale* (con espinas)

Variedades

Se han reconocido cuatro variedades comunes de *Solanum quitoense* Lam. La variedad agria (*S. quitoense* Lam. var. *quitoense*) que se caracteriza por no tener espinas y por poseer frutos esféricos, poco achatados de color amarillo-rojizo, de 5 a 7 cm, con pulpa verde y sabor agridulce, además que es muy susceptible a la marchitez vascular. La variedad Baeza dulce (*S. quitoense* Lam. var. *quitoense*) con características similares a la agria, con la única diferencia de producir frutos más grandes (> 7cm) con epidermis más gruesa, pulpa gruesa y sabor dulce. Ambas variedades se encuentran distribuidas principalmente en Ecuador (Revelo et al., 2010).

Mientras que la variedad espinosa (*S. quitoense* Lam. var. *septentrionale*) se diferencia de las otras por tener espinas en el tallo, ramas y hojas, tiene frutos de color rojizo de sabor más ácido y con 5 cm de diámetro, además que puede ser encontrada en el centro de Colombia, Panamá y Costa Rica (Gancel et al. 2008). Finalmente, la variedad INIAP-Quitoense 2009 (*S. quitoense* Lam. var. *quitoense*) que se originó a partir de una selección de la variedad Baeza en el periodo del 2005-2009, carece de espinas, sus frutos son redondos con pulpa verde con bajos niveles de oxidación (Revelo et al., 2010).

Adicionalmente, se han obtenido híbridos de naranjilla como: el híbrido “Puyo” producto de un cruce entre *Solanum quitoense* var. *quitoense* agria y *Solanum sessiliflorum* (cocona), caracterizada por generar frutos mucho más pequeños y con pulpa de color verde amarillento (Gancel et al., 2008). “Palora” es otro de los híbridos de naranjilla, con frutos mucho más grandes que los híbridos “Puyo”, resultado del

cruzamiento entre la *Solanum quitoense* var. *quitoense* Baeza dulce y *Solanum sessiliflorum*. Siendo estas dos últimas, las variedades más cultivadas en Ecuador junto con las variedades agria y dulce (Revelo et al., 2010)

Características botánicas y genéticas

La planta de naranjilla tiene una raíz principal que se extiende hasta 50 cm junto con un alto porcentaje de raíces secundarias fibrosas superficiales (Gómez et al., 2014), mientras que los híbridos no tienen raíz principal pero si gran cantidad de raíces laterales superficiales (Revelo et al., 2010). Tienen tallos cilíndricos, leñosos y pubescentes de color verde cuando la planta es joven y color café en su etapa adulta, que a su vez disponen de gran cantidad de ramas alternadas, además de hojas de color verde por el haz y violeta por el envés, de 40 cm de largo y 34 cm de ancho y forma oblonga-ovalada (Revelo et al., 2010; Gómez et al., 2014; Dávila et al., 2018).

Sus flores son pentámeras y aparecen en forma de racimos axilares cortos (entre 5 y 10 flores en c/axila), se caracterizan por ser hermafroditas y autofértiles, por tener pétalos de color crema a blanco en el haz y morado en el envés, pistilos largos y cáliz de color verde (Gómez et al., 2014). Sus frutos de color naranja intenso, de allí su nombre de naranjilla (naranja pequeña), son bayas globosas ovoides de aproximadamente 3 a 8 cm de diámetro con pulpa de color amarillo verdoso, y se encuentran recubiertos de pequeñas pubescencias o espinas (pelos cortos) que se pueden desprender fácilmente cuando la fruta esté madura (Gancel et al. 2008). Dichos frutos son muy apetecidos a nivel nacional e internacional por el sabor agridulce y refrescante de su jugo, por su aroma y sobre todo por su alto contenido de vitamina A, C, B1 y B2 (Vásquez et al., 2011), por lo que es utilizada como ingrediente principal de bebidas, helados, mermeladas, postres, saborizantes, etc. Cada fruto dispone de aproximadamente 1000 semillas redondas y lisas de color amarillo verdoso en su interior (Gómez et al., 2014). Las plantas de naranjilla suelen iniciar su producción entre

los 8 y 12 meses de edad, lo que va en función de las condiciones de cultivo, sobre todo de la temperatura (Gómez et al., 2014).

En cuanto a la genética de la planta, el número somático ($2n$) de cromosomas informado para *Solanum quitoense* es de 24 (Gómez et al., 2014). Este número determina la compatibilidad de la naranjilla con otras especies y con sus híbridos (Revelo et al., 2010).

Condiciones ambientales del cultivo

La naranjilla se cultiva principalmente en zonas con elevaciones de 850 a 1500 msnm., a temperaturas de 17-29°C, humedad relativa de 78 a 92%, precipitaciones de 1800 mm a 4000 mm/año, en zonas con plena exposición al sol y con suelos profundos ligeramente inclinados de textura franca, franco arcillosa o franco arenosa, ricos en materia orgánica y bien drenados, y con pH de 5.3 a 6.0 (INIAP, 2014). Las plantas de naranjilla tienen hojas de gran tamaño y ramas que podrían quebrarse fácilmente, por lo que se considera que esta planta no resiste lugares ventosos y crecen en buenas condiciones cuando se encuentran en zonas libres de vientos fuertes (Revelo et al., 2010)

Importancia económica del cultivo en Ecuador

Las plantas de naranjilla tienen gran demanda en los mercados agroindustriales sobre todo por el agradable aroma, sabor y color de su fruto al ser utilizado como ingrediente en la cocina. Además, los frutos de naranjilla son ricos en vitaminas, proteínas y minerales, por lo que son un gran aporte nutricional a la ingesta diaria (Gancel et al., 2008). Por tales motivos, la naranjilla ha registrado un crecimiento constante en los últimos años (2014-2019) con respecto a las exportaciones, al pasar de 33,22 a 204,44 toneladas (t), siendo sus principales destinos: Estados Unidos (92%) y España (6%).

En Ecuador, el cultivo de *Solanum quitoense* Lam. en el año 2009 llegaba a ocupar 5.025 ha con una producción promedio de 22.596 toneladas y un rendimiento promedio de 4.5 t. ha^{-1} ; sin embargo el rendimiento esperado está cerca de 10 t. ha^{-1} (MAGAP, 2009; INIAP, 2019). Pero en el 2019, la producción a nivel nacional de naranjilla fue de 6.749,38 toneladas a partir de una superficie sembrada de 2.038,21 ha, con un rendimiento de $5,60 \text{ t. ha}^{-1}$ **Tabla 1**; siendo las principales provincias con mayor superficie sembrada: Carchi (33%), Zamora Chinchipe (14%), Pichincha (16%) y Morona Santiago (10%). Por otro lado, la provincia con el nivel de producción más alto fue el Carchi, mientras que Imbabura fue la provincia con el nivel de rendimiento más alto aunque con una producción menor a Morona Santiago (SIPA, 2019).

Tabla 1

Superficie, producción y rendimiento del cultivo de naranjilla en Ecuador

Región	Superficie cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t. ha^{-1})
2009			
Oriente	4111	18588	4,52
Sierra	914	4008	4,39
Total Nacional	5025	22596	4,50
2019			
Total Nacional	1205	6749	5,60

Nota Recuperada de la Dirección de Información Geográfica Agropecuaria de MAGAP, 2009, como se citó en INIAP, 2019 y del Sistema de Información Pública Agropecuaria (2019).

Los agricultores se han visto en el conflicto de disminuir la producción de naranjilla debido a múltiples factores que afectan a los frutos como la presencia de enfermedades fúngicas (INIAP, 2019). El Sistema de Información Pública Agropecuaria, en el año de 2019, registró que la naranjilla se ha visto afectada en aproximadamente

5.086 toneladas, debido a plagas y enfermedades (55%), sequías y heladas (28%) y edad de la plantación (18%). Por tal motivo, en los últimos años se están desarrollando estudios que permitan mejorar la planta, como el uso de variedades con resistencia genética enfermedades y nematodos, mejoramiento de la composición aromática de la pulpa, cascara y hojas y mejoramiento en los tratamientos post cosecha (INIAP, 2019).

Enfermedades fúngicas en *Solanum quitoense* Lam.

Las principales plagas fúngicas que se presentan en las diferentes etapas del cultivo de naranjilla son: *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum* spp y *Cladosporium* spp., las cuales se detallan en la Tabla 2 (Dávila et al., 2018). Otras enfermedades de menor importancia son causadas por los hongos *Botrytis* sp. y *Cercospora* sp., mismas que producen manchas necróticas en las hojas (Revelo et al., 2010).

Tabla 2

Enfermedades fúngicas en el cultivo de Solanum quitoense Lam.

Enfermedad	Agente causal	Síntomas
Marchitez vascular	<i>Fusarium oxysporum</i>	Provoca marchitez y muerte de la planta.
Lancha, tizón tardío o cogora	<i>Phytophthora infestans</i>	Marchitez de cogollos y hojas, necrosamiento de los tallos y muerte de las ramas o toda la planta.
Antracnosis	<i>Colletotrichum</i> spp.	Manchas redondas de color café oscuro y momificación de los frutos.
Esclerotinosis, pudrición húmeda o algodonosa	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pudrición húmeda en la zona afectada.
Mancha clorótica de la hoja	<i>Cladosporium</i> sp.	Decoloración de las hojas. Puede provocar la defoliación de la planta.

Nota Información recuperada de Revelo et al. (2010)

Antracnosis

La antracnosis u ojo de pollo es una de las enfermedades más representativas de las plantas de naranjilla en Ecuador. Logra desarrollarse en las plantas de naranjilla que crecen en un clima semitropical húmedo en el que existe condiciones de alta humedad relativa y continuas precipitaciones, causando la pérdida total del fruto en cualquier estado de desarrollo y siendo muy agresiva sobre los 1400 msnm (Ochoa et al., 2010).

Los síntomas comunes tras una infección por el agente causal de la antracnosis (hongos del género *Colletotrichum*) incluyen: tejido necrótico redondo ligeramente hundido acompañado de masas de conidios anaranjados o rosados (Ochoa et al., 2010). Esta enfermedad puede ser fácilmente visible en tejidos superficiales de las plantas como inflorescencias, frutos y hojas, sin embargo también puede atacar partes subterráneas como raíces y tubérculos (Prusky et al., 2000). En el caso de infectar las inflorescencias, se forman manchas en los pétalos o las flores pueden caerse; mientras que en los frutos en formación causa su momificación o en frutos maduros e inmaduros se produce una lesión circular con esporulación de color naranja. Estos síntomas también pueden aparecer al momento de transportar y almacenar las frutas de naranjilla, por lo que se considera que el agente causal de la antracnosis ataca pre-cosecha y post-cosecha (Ochoa et al., 2010).

El manejo utilizado actualmente en el Ecuador para luchar contra la antracnosis se basa en la detección temprana de la enfermedad, para posteriormente eliminar aquellas partes de la planta con síntomas y finalizar con un control químico a partir de fungicidas (Ochoa et al., 2010). Caicedo et al. (2017) mencionan que la antracnosis puede controlarse hasta en un 80% con fungicidas como mancozeb, clorotalonil, captan, benlato y carbendazim. Mientras que Ochoa et al. (2010) mencionan que en el caso de

encontrar síntomas en las inflorescencias lo adecuado sería aplicar un fungicida sistémico como el sulfato de cobre pentahidratado y en el caso de que sean en los frutos (antes de la esporulación) se debería aplicar difeconazol, triadimefon o azoxistrobina. Sin embargo, el uso incontrolado de estas sustancias químicas a largo plazo puede generar problemas de poca sensibilidad a los fungicidas o presencia de residuos químicos en los frutos que a futuro son consumidos por el ser humano y pueden llegar a ser un problema para la salud.

Agente causal de la antracnosis

El hongo filamentoso del género *Colletotrichum* es uno de los patógenos que mayor impacto económico genera en los cultivos de zonas tropicales, subtropicales y templadas, por lo que es de gran importancia agrícola. Los cultivos que pueden infectarse gravemente por *Colletotrichum* son: cereales, gramíneas, legumbres, plantas ornamentales, hortalizas y frutales (Prusky et al., 2000).

Este patógeno tiene la capacidad de causar infecciones latentes o inactivas y viven dentro de los tejidos sanos antes de mostrar síntomas (Dávila et al., 2018). Además, es considerado como uno de los patógenos post-cosecha más importantes, aunque puede atacar tanto frutos en desarrollo (pre-cosecha) como frutos maduros (post-cosecha o almacenamiento).

Actualmente, el estudio de las especies de *Colletotrichum* es de gran importancia por su impacto económico alrededor del mundo debido a que afecta a cultivos de relevancia agronómica, además que es utilizado como un sistema modelo para estudiar procesos de infección, procesos de patogenicidad de los hongos e inducción de enzimas de defensa (Prusky et al., 2000, Caicedo & Higuera, 2007; Arrieta et al., 2010).

Proceso de infección del agente causal de la antracnosis

Las especies de *Colletotrichum* logran invadir a sus huéspedes de forma intracelular o subcuticular/intramural a partir de estructuras especializadas, como los tubos germinativos, apresorios, clavijas de penetración, vesículas de infección, hifas primarias e hifas secundarias. La invasión intracelular se basa en que los conidios se adhieren a la cutícula del tejido del huésped y germinan produciendo tubos germinales que a su vez se diferencian en apresorios melanizados; y en la base de los apresorios surgen las clavijas de penetración que ingresan directamente a la cutícula. Por otro lado también puede existir una invasión indirecta en la que no participan los apresorios, y la penetración del hongo se da a través de estomas o heridas, y el hongo se desarrolla debajo de la cutícula (Prusky et al., 2000).

El proceso de infección se basa en dos fases: biotrófica y necrotófica. La fase biotrófica se relaciona con la producción de micelios intracelulares en las células epidérmicas infectadas, que pueden durar desde menos de 24 horas hasta más de 3 días. Esta fase se basa en que las células del huésped comienzan a morir y las hifas primarias intracelulares comienzan a obtener nutrientes de las células muertas, estableciendo una relación biotrófica. Las células del huésped mueren pero no se inducen mecanismos de defensa del huésped, por lo que no se producen síntomas macroscópicos como las lesiones marrones. Mientras que en la fase necrotrofica, las hifas secundarias se extienden inter e intracelularmente, las células del huésped mueren y se activan enzimas despolimerizantes fúngicas que degradan las paredes celulares del huésped dando como resultado la aparición de los síntomas de la antracnosis (Prusky et al., 2000).

Complejo de especies de *Colletotrichum*

Las especies del género *Colletotrichum* se clasifican en 14 complejos o agregados de especies: *C. caudatum*, *C. graminícola*, *C. spaethianum*, *C. destructivum*,

C. dematium, *C. gigasporum*, *C. boninense*, *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. orbiculare*, *C. dracaenophilum*, *C. magnum* y *C. orchidearum*; y cada complejo muestra variabilidad fenotípica y genética entre y dentro de los complejos (Prusky et al., 2000, Da Silva et al., 2020). Ciertas especies de estos complejos se han identificado como endófitas, saprófitas, entomopatógenas y patógenas humanas (Da Silva et al., 2020).

Según el Compendio de Especies Invasoras – CABI (2021) la taxonomía de los hongos del género *Colletotrichum* es:

Dominio: Eucariota
Reino: Fungi
Filo: Ascomycota
Subfilo: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Subclase: Sordariomycetidae
Familia: Glomerellaceae
Género: *Colletotrichum*

Hasta el 2012, se habían aceptado 31 especies dentro del complejo de *C. acutatum*, agrupados en cinco clados, que se diferenciaban por su diversidad fenotípica, filogenética y por tener preferencias para ciertos hospedantes (Damm et al., 2012). Además se ha visto que este complejo contiene especies capaces de atacar una amplia gama de hospedantes (Da Silva et al., 2020). Incluso, se ha descrito una forma sexual de *C. acutatum* conocida como *Glomerella acutata*, resultante del experimentos de apareamiento (Damm et al., 2012).

En Ecuador y en el mundo los estudios sobre caracterización de los hongos del género *Colletotrichum* que ataquen plantas de naranjilla son escasos, a excepción del reporte de Dávila et al. (2018) que realizaron la identificación de comunidades fúngicas

en hojas sintomáticas de naranjilla de la región amazónica del Ecuador, entre ellas *Colletotrichum* sp.. Gran parte de los estudios existentes, se basan en el ataque de este fitopatógeno a otras plantas. Falconí (2013), Lalangui (2015), Caicedo et al. (2017), Guamán (2018) y Castro et al. (2019) lograron identificar y caracterizar *C. acutatum* y *C. tamarilloi* a partir de un análisis morfológico y molecular de muestras de tomate de árbol (*Solanum quitoense*) de la sierra ecuatoriana. Cajas (2021) realizó el primer reporte de un complejo de especies de *Colletotrichum* capaces de infectar hojas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) de la región interandina del Ecuador, al igual que Riera (2015) quien logro caracterizar *C. frutícola* y *gloeosporoides* en bananas de la costa del Ecuador.

Métodos de identificación del agente causal de la antracnosis

Para lograr la identificación de especies del género *Colletotrichum* se utiliza un enfoque polifásico que envuelve análisis molecular de varios marcadores o barcodes (código de barras), análisis morfológico y fisiológico, además de pruebas de patogenicidad, análisis de producción de metabolitos y estudios ecológicos (Da Silva, 2020).

Caracterización morfológica (macro y microscópica)

La antracnosis puede ser diagnosticada tanto en frutos maduros como inmaduros. En el caso de frutos maduros se pueden observar lesiones redondeadas de apariencia café que con el tiempo se vuelven negras, dichas lesiones tiene una forma hundida en el centro y crecen rápidamente hasta cubrir todo el fruto a tal punto que pueden llegar a deformarse. Caso similar se observa en los frutos verdes, mismos que pueden presentar lesiones negras con centros algodonosos blancos que representan el micelio y puntos de color naranja o salmón que corresponde a las esporas o conidios (Montes et al., 2010).

En el caso de *Colletotrichum* existe un pequeño conjunto de caracteres morfológicos que pueden definirse para clasificar las especies del género, tales como: color de las colonias, tasa de crecimiento, el tamaño y forma de los conidios, las características de los apresorios, producción de pigmentos y presencia de setas (Da Silva et al., 2020). Sin embargo, ciertas características pueden dar resultados poco certeros, debido a que su observación es subjetiva. Además, que las características morfológicas pueden variar según las condiciones ambientales y el tiempo de los cultivos (Prusky et al., 2000).

Específicamente, la morfología de los conidios y la presencia de setas son características específicas de varias especies del mismo complejo; pero la tasa de crecimiento varía entre aislados de la misma especie. Mientras que el color de las colonias pueden variar entre cultivos monospóricos del mismo aislado (Da Silva et al., 2020).

Conidios de Colletotrichum

Una característica morfológica importante de las especies de este complejo es la forma de sus conidios, pues son fusiformes, elipsoides o cilíndricos con ambos o un solo extremo agudo o redondeado, hialinos, sin septos, de paredes delgadas, con un tamaño de 8-16 x 2.5-4 μm (Damm et al., 2012; Guamán, 2018).

Los conidios de las especies de *Colletotrichum* se forman en conidiomas acervulares y en medios de cultivo pueden encontrarse en el micelio aéreo (Damm et al., 2012). Dichos conidios poseen una capa externa compuesta en gran parte por glicoproteínas y caracterizada por tener una estructura esponjosa y porosa. Dichas glicoproteínas de superficie le dan la propiedad adhesiva a los conidios para que puedan unirse rápidamente a la superficie del tejido vegetal (Prusky et al., 2000).

Un problema relacionado con *Colletotrichum* es que puede producir conidios secundarios en los medios de cultivo a partir de esporas primarias en germinación

(Damm et al., 2012). Dichos conidios secundarios generalmente son más pequeños y tienen formas variadas, sobre todo cuando el cultivo es antiguo. Por ello, para obtener mejores resultados es importante realizar aislados con protocolos de cultivo idénticos y en el caso de que el cultivo sea antiguo se deberían realizar subcultivos puros (Prusky et al., 2000).

Apresorios de *Colletotrichum*

En la mayoría de especies de *Colletotrichum*, la diferenciación de un apresorio es esencial para la penetración del huésped. Un apresorio surge cuando el crecimiento del tubo germinativo conidial se detiene y la punta se hincha; y su maduración implica la formación de un poro de penetración en la base de la célula y la secreción de materiales de matriz extracelular (Prusky et al., 2000).

En el complejo de especies de *C. acutatum* se pueden observar pocos apresorios simples y pigmentados y no se diferencia ninguna seta (Damm et al., 2012).

Caracterización molecular

Los análisis de ácidos nucleicos permiten obtener una clasificación más objetiva de los subgrupos de cada taxón. La mayoría de los análisis moleculares se basan en: datos de patrones de bandas electroforéticas y datos de secuencia a partir de PCR. El primero incluye análisis RAPD y RFLP, que frecuentemente se han utilizado para comparar poblaciones y grupos infraespecíficos de hongos. Son métodos más baratos, fáciles y rápidos; sin embargo, las diferencias en los patrones de las bandas no entregan una divergencia genética significativa, por lo que no pueden ser usados de forma efectiva en estudios filogenéticos (Prusky et al., 2000).

Los datos de secuenciaciones solían ser un poco más laboriosos y un tanto costosos, pero lograron ser procesos automatizados y se disminuyó la dificultad de la técnica. Las técnicas de secuenciación pueden ser utilizadas en estudios comparativos de secciones variables del genoma como las regiones ITS, en las que se pueden

detectar mutaciones puntuales. Actualmente, el costo de las secuenciaciones ha ido disminuyendo, y se dispone de una amplia base de datos para el análisis filogenético (Prusky et al., 2000).

Marcadores moleculares

En el caso de *Colletotrichum* la caracterización molecular se ha enfocado en dos partes del genoma: en el ADN mitocondrial (ADNmt) y en el ADN ribosomal nuclear (ADNr) (Prusky et al., 2000).

Se ha informado la eficacia de realizar análisis filogenético molecular multilocus (MLSA) a partir de las secuencias :gen ribosómico nuclear 5.8S con los dos espaciadores transcritos internos (ITS), actina (ACT), beta-tubulina (TUB2), secuencias parciales de la quitina sintasa 1 (CHS-1), del intrón de 200 pb de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), histona3 (HIS3), calmodulina (CAL), del intrón de 900 pb de la glutamina sintetasa (GS), ADN liasa (apn2) y de la región intergénica de los genes apn2 y MAT1-2-1 (ApMat) para el reconocimiento de especies de *Colletotrichum* (Damm et al., 2012; Da Silva, 2020).

Gen del Espaciador Transcrito Interno (ITS)

El ADNr de los hongos incluye los genes 18S, 5.8S y 28S útiles para codificar ARNr a partir de su secuencia de nucleótidos relativamente conservada, y la región ITS (ITS1 e ITS2) que son áreas de nucleótidos variable y no se traducen en proteínas, pero que se han utilizado para detectar divergencias evolutivas recientes en las especies del género *Colletotrichum* al ser utilizados como complemento de un análisis multilocus con el fin de identificar el género y el posicionamiento de las especies en uno de los complejos de *Colletotrichum* (Guamán, 2018).

Se han realizado análisis de la subunidad pequeña (18S), las regiones ITS que incluye el gen 5.8S y la subunidad grande (28S); las ITS no son funcionales, son regiones más variables y útiles para la diferenciación de taxones a nivel de especie e

inferior, mientras que las regiones 18S y 28S al ser funcionales, son regiones más conservadas y útiles para el análisis filogenético a nivel de género y superior (Prusky et al., 2000). La región ITS es el principal marcador de hongos debido a su alta probabilidad de identificar especies de hongos a través de una medida de distancias genéticas (Dávila et al., 2018). Sin embargo, se ha identificado que las especies del complejo *C. acutatum* son filogenéticamente diversas, incluso se han visto cepas con divergencias del 5.8% en la secuencia ITS-1, cuando otras especies de hongos suelen tener niveles de 2-4% (Sreenivasaprasad et al., 1996).

Gen de actina (ACT)

La actina junto con la tubulina son proteínas que componen el citoesqueleto fúngico, específicamente de los microfilamentos y microtubulos. La actina tiene un papel importante en algunos procesos celulares como la motilidad celular, división celular, crecimiento celular y diferenciación celular, además de mantener la integridad del citoesqueleto (Guamán, 2018).

Este gen es altamente conservado y funcional, por lo que es útil para los análisis filogenéticos pues forma parte de una estructura primaria de los hongos que pertenecen al género *Colletotrichum* (Guamán, 2018).

Postulados de Koch

Dentro del enfoque polifásico para identificar patógenos fúngicos se encuentra la determinación de la capacidad del organismo para causar daño al huésped (patogenicidad), lo que se puede llevar a cabo con la aplicación de los postulados de Koch. Las técnicas postuladas por Robert Koch se basaron en la identificación, aislamiento y visualización del agente patógeno. Gracias a ello, en 1882 descubrió a *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis pulmonar y fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina en 1905 (Bhunjun et al., 2021).

Este método confiable para establecer si un microorganismo es la causa de una enfermedad se basa en tres conceptos básicos: a) el patógeno ocurre en cada aparición de la enfermedad, b) el patógeno no ocurre en otras enfermedades como un agente fortuito y no patógeno; y c) después de estar completamente aislado y crecer repetidamente en cultivo puro, el patógeno puede inducir la enfermedad nuevamente (Rivers, 1937). Dichos conceptos contemplan los tres enunciados originales de Koch, sin embargo en la versión más sencilla se resumen cuatro postulados: 1) el patógeno debe aislarse siempre de un hospedero enfermo y nunca de hospederos sanos, 2) cuando el hospedero esté enfermo el patógeno debe aislarse, caracterizarse y cultivarse *in vitro* en un medio puro y libre de otros microorganismos (bajo condiciones axénicas), 3) si el patógeno se inocula a un hospedero sano debe reproducir y desencadenar el mismo cuadro patológico inicial, 4) el patógeno debe reaislarse en un cultivo puro y debe coincidir con el aislamiento inicial en sus rasgos morfológicos y biológicos relevantes (Fuentes, 2007; Volcy, 2008).

Capítulo III: Metodología

La recolección de los frutos de naranjilla con sintomatología de antracnosis y los aislamientos del microorganismo relacionado con la enfermedad fueron realizados en colaboración con el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) – Estación Experimental Santa Catalina. Mientras que las pruebas moleculares se realizaron en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen.

Áreas de investigación y recolección del material vegetal

Se obtuvieron frutos de naranjilla con síntomas comunes de antracnosis, como lesiones circulares de color marrón/negro **Figura 1**, de tres provincias de la zona tropical e interandina del Ecuador, 2 muestras de Pichincha, 1 de Santo Domingo de los Tsáchilas y 2 de Tungurahua **Tabla 3**. Todas las muestras obtenidas correspondieron a la variedad común de *Solanum quitoense*, a excepción de la muestra de San Francisco – Río Negro que corresponde al híbrido Puyo. Una vez recolectadas, se colocaron todas las muestras en fundas plásticas desinfectadas y se transportaron al laboratorio de fitopatología del INIAP. Cada muestra fue identificada con un código que incluyó su ubicación y provincia (RV-Tu, RN-Tu, NM-SD, T1-Pi, T2-Pi).

Tabla 3

Coordenadas geográficas de los frutos de Solanum quitoense Lam. con antracnosis

Muestra	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m.)
Tumbaco 1 – Agrocalidad (T1-Pi)	0°13' 03"S	78°24'48.3"W	2.348
Tumbaco 2 – Agrocalidad (T2-Pi)	0°13' 03"S	78°24'48.3"W	2.348
Nuevo Machachi – Tandapi (NM-SD)	0° 20' 44" S	78° 52' 23" W	1462
Río Verde – Vía Baños (RV-Tu)	1° 24' 35" S	78° 16' 30" W	1418
Río Negro – Vía Baños (RV-Tu)	1° 24' 50" S	78° 13' 27" W	1237

Nota La información de la tabla fue obtenida por el Ing. José Ochoa – Investigador de Fitopatología del INIAP.

Aislamiento y purificación del hongo

Se empleó la metodología utilizada en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal del INIAP – Estación Experimental Santa Catalina para obtener cultivos monospóricos puros de *Colletotrichum*.

Aislamiento primario

Los frutos infectados se cortaron en pequeños pedazos de 5 mm con un bisturí limpio (2,5 mm de tejido enfermo y 2,5 mm de tejido sano) y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante dos minutos, posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada. Todos los trozos fueron llevados a cámara de flujo laminar para ser cultivados en agar dextrosa de papa acidificada (PDAa - comercial) e incubadas durante 8 días a 25 °C. Dicho procedimiento se realizó para las muestras obtenidas en San Francisco – Río Negro.

Debido a que ya se habían obtenido cultivos puros de *Colletotrichum* de T1-Pi, T2-Pi, NM-SD y RV-Tu (dos meses previo al inicio de esta investigación), se decidió realizar nuevos cultivos monospóricos. Para proceder con la reactivación de dichos aislamientos, se realizó un raspado con bisturí de las esporas y se diluyeron en 1 mL de agua estéril. Dicha dilución se mezcló en vortex, se tomó una gota, se colocó en el centro de una caja Petri con PDAa y se dispersó con un asa de siembra en L. Tras 5 días de incubación se aisló una sola colonia y se sembró en un nuevo medio PDAa.

Aislamiento secundario (purificación)

Se realizó un aislamiento de espóra única basada en un proceso de purificación para obtener cultivos puros de *Colletotrichum* de todas las muestras. Dicho proceso consistió en cortar con bisturí un pedazo de 5x5 mm del margen blanco del micelio (parte más joven de la colonia) del aislamiento primario, se sembró en medio PDAa y se incubó durante 8 días a 25°C.

Caracterización morfológica

Identificación macroscópica

Para el análisis macroscópico del aislado monospórico se consideraron ciertas características macroscópicas como: color de la colonia, margen y esporulación (secreciones anaranjadas) de la parte frontal y reverso de las cajas Petri (Caicedo et al., 2017).

Identificación microscópica

Se realizó una visualización microscópica a 40X de una placa portaobjetos con parte de la superficie del micelio pegado a una cinta adhesiva transparente. Para ello se examinó: tamaño, forma y color de los conidios, utilizando un microscopio óptico conectado a una cámara EUROMEX “CMEX5_WIFI” y el software ImageFocusAlpha para medir la longitud y ancho, en micras, de 10 conidios por aislamiento. Para la longitud de los conidios se consideró la medida de un extremo a otro, y para el ancho se tomó la zona más ensanchada. A partir de estos datos se obtuvo el valor del promedio, rango y desviación estándar (Guamán, 2018).

El criterio para definir la forma de los conidios se basó en el estudio de Živković et al. (2010), en el que F: representa la forma fusiforme, C: cilíndrico, To: extremos redondeados y Ta: un solo extremo agudo.

Caracterización molecular

Extracción del ADN fúngico

El ADN genómico de los aislados se obtuvo a partir de una modificación de la metodología propuesta por Berrendero (2008). Para ello se cultivó el micelio fúngico de cada aislado durante 7 días en PDAa y se tomó aproximadamente 50 mg de muestra a partir de un raspado con un bisturí estéril. La muestra se colocó en un microtubo de 1.5 mL con 3 perlas de vidrio estériles y se añadió 500 μ L del buffer de extracción (2,5% p/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH8 y 2 μ L de β -mercaptoetanol).

Se agitó y maceró la muestra con un vortex a velocidad máxima en 2 ocasiones hasta obtener una muestra pulverizada. Se incubó en baño María a 60°C durante 30 minutos con agitación cada 10 minutos, posteriormente se añadieron 500 µL de cloroformo frío, se mezcló por 30 segundos y se dejó reposar unos minutos. Se centrifugó a 14 500 g por 10 minutos y se recuperó aproximadamente 300 µL el sobrenadante para colocar en un nuevo tubo estéril de 1.5 mL y se adicionó un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 µL de acetato de sodio 3M y 300 µL de etanol 70% filtrado para precipitar el ADN durante toda la noche a -20 °C. A la mañana siguiente se centrifugó a 14 500 g por 17 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron 2 lavados con 200 µL de etanol 70% y se secó el pellet durante 15 a 20 minutos con la ayuda de una cámara de flujo laminar. Finalmente se resuspendió el pellet de ADN con 25 µL de agua DEPC, se añadió 1 µL de RNAsa y se dejó incubar por 30 minutos a 37 °C. Se midió la concentración y calidad del ADN fúngico con un Nanodrop 2000. En aquellos aislados en los que la concentración de ADN era superior a 150 ng/uL se realizaron diluciones. Las muestras obtenidas se dejaron almacenadas a -20°C hasta utilizarlas en la amplificación por PCR.

Amplificación por PCR y secuenciación

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Labnet MultiGene de Fisher. Se amplificaron los fragmentos ITS y ACT utilizando los primers de la **Tabla 4**. Se empleó la metodología del Laboratorio de diagnóstico molecular IDgen para las amplificaciones. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 uL, contenido de 12.5uL de un master mix comercial (2X Taq Mastermix with dye de ABM), 8.5uL de agua libre de nucleasas, 1uL cada primer, y 2 uL de DNA (150 ng/uL). Dichas reacciones fueron realizadas en un termociclador en ciclos comprendidos de 3 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C , seguido de una temperatura de hibridación de los cebadores a 53.5°C (ITS) y 58°C

(ACT) por 30 segundos, 45 segundos de extensión a 72°C y 10 minutos de extensión final a 72°C (Caicedo et al., 2017).

Tabla 4

Primers utilizados en la amplificación de PCR

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Referencias
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone & Kohn (1999)
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	

Para verificar que las amplificaciones se realizaron correctamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para ello se disolvió 0,4 g de agarosa en 40 mL de buffer TBE 1X con la ayuda de un horno microondas. Se dejó enfriar la mezcla hasta ser tolerable al tacto y se añadió 3 µL de bromuro de etidio. Posteriormente, se vertió la solución en la cámara de electroforesis junto con el peine para formar los pozos para las muestras. Se esperó hasta que el gel solidifique, se retiró el peine y se colocó buffer TBE 1X hasta cubrir el gel. Finalmente, se colocó 2 µL de ADN Marker 100 pb (Applied Biological Materials) y 2 µL de los extractos de ADN en cada uno de los pocillos. Una vez cargadas las muestras se conectó la cámara de electroforesis a una fuente de poder a 85V y 35mA por 30 minutos.

Los amplicones de ADN (ITS y ACT) se secuenciaron utilizando secuenciación Sanger en el laboratorio de MacroGen, Inc (Corea del Sur).

Análisis filogenético

Cada secuencia de ADN obtenida fue ensamblada y editada manualmente con el software BioEdit - versión 7.2.5. Las secuencias consenso obtenidas para cada marcador fueron comparadas con la base de datos de GenBank (sequences from type

material) a partir de una búsqueda de homólogos en la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI - The National Center for Biotechnology Information (Caicedo et al., 2017).

Se realizó una alineación múltiple con MEGAX (versión 10.1.8) basado en el algoritmo de MUSCLE, de todas las secuencias obtenidas en el estudio además de aquellas recuperadas del GenBank del NCBI correspondientes a especies de *Colletotrichum acutatum* registradas en América y en la familia Solanacea (Damm et.al, 2012). La alineación fue evaluada a partir del programa en línea Gblocks (v0.91b) (http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/one_task.cgi?task_type=gblocks), en el que se eliminaron regiones de baja calidad y se obtuvo un archivo en formato FASTA para ser utilizado en el análisis filogenético (Dereeper et.al, 2008).

El análisis filogenético utilizó un total de 29 secuencias, 5 del estudio, 24 recuperadas de la base de datos del GenBank, incluido el grupo externo *Monilochaetes infuscans* CBS 869.96 (Jayawardena et al. 2016), 20 del complejo *C. acutatum* (Damm et al., 2012; Schoch et al., 2014; Dávila et al. 2018) y 3 de *C. gloeosporioides* (Weir et al. 2012) **Anexo 1**. Se utilizó un análisis molecular multilocus de las secuencias ITS y ACT concatenadas con el programa SequenceMatrix. Para obtener el árbol filogenético se utilizó la plataforma CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/>) en el que se subieron las secuencias concatenadas para ser analizadas con un método de máxima verosimilitud (ML) en base al programa Randomized Axelerated Maximum Likelihood – RaxML (Stamatakis, 2014). Finalmente, para visualizar el árbol filogenético consenso con mayor verosimilitud se utilizó nuevamente MEGAX.

Postulados de Koch

Se utilizaron todos los aislados de *Colletotrichum* para comprobar los postulados de Koch en frutos sanos de naranjilla (*Solanum quitoense* variedad *quitoense*) en

cámaras húmedas a 25°C y 47% de humedad en el laboratorio de fitopatología del INIAP. Se utilizaron frutos sanos inmaduros y maduros.

La desinfección de los frutos sanos consistió en un lavado con agua para quitar las pubescencias, posteriormente se los sumergió en una solución de etanol 70% por 1 minuto y en hipoclorito de sodio al 5% por 2 minutos. A la vez se preparó el inóculo a partir de suspensiones de conidios de cada aislado ajustadas a 1×10^6 conidios/mL (Caicedo et al., 2017) y 1×10^5 conidios/mL (Pinto et al., 2013) en agua destilada con la ayuda de una cámara de Neubauer.

El método de inoculación fue por herida y goteo (Gañán et al., 2015). Para ello, se realizaron tres heridas en cada fruto de naranjilla a partir de una punción con una jeringa Hamilton y se inoculó 10 uL de la solución de esporas sobre la herida. El procedimiento se realizó con tres repeticiones por cada aislado, además de un control en el que se inoculó agua estéril.

El análisis de resultados se basó en una evaluación del apareamiento de signos y síntomas en los frutos de naranjilla heridos e inoculados con los aislados a los 7 días; se observó el color de la lesión y se midió su diámetro en mm con un calibrador Vernier. Con estos datos del crecimiento radial del hongo se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante un diseño experimental completamente al azar con nueve repeticiones y una prueba de Tukey (con nivel de significancia $\alpha = 0.05$) para ver si las diferencias de patogenicidad entre los cinco aislados son significativas; para ello se utilizó el Software Infostat (Caicedo et al., 2017; Nieto et al., 2019).

Además, a los 7 días se reisoló el hongo y se cultivó en medio PDAA para confirmar el agente causal de la antracnosis en frutos de naranjilla a partir de un análisis de las características macro y microscópicas.

Capítulo IV: Resultados

Recolección de los frutos

Se observó en cada uno de los frutos muestreados que la sintomatología común eran lesiones circulares ligeramente hundidas de color marrón en los bordes y negro en el centro, además que en algunos frutos se logró observar masas de esporas de color anaranjado en el centro de la lesión necrótica **Figura 1**.

Figura 1

Síntomas comunes de la antracnosis en frutos de naranjilla obtenidos de Pichincha, Santo Domingo y Tungurahua



Nota El gráfico representa los frutos de naranjilla con síntomas comunes de antracnosis (lesiones circulares marrones). Fotografías tomadas por el Ing. José Ochoa – Investigador de Fitopatología del INIAP.

Caracterización morfológica

Evaluación macroscópica de los aislados monospóricos

Una vez obtenidos los cinco aislados monospóricos en medio PDAA (**Figura 2- Figura 6**), se observó que el 100% tenían un crecimiento circular.

La mayoría de los micelios cambiaron de color blanco pálido a gris verdoso oscuro (T1-Pi y T2-Pi) y anaranjado grisáceo oscuro (NM-SD, RV-Tu y RN-Tu) con un margen de color blanco en todos los casos y micelios algodonosos, además se pudo observar que la parte posterior de todos los aislados era de color salmón/anaranjado alrededor de todo el micelio, lo que indica la presencia de masas conidiales y por ende el proceso de esporulación de los hongos **Tabla 5**.

El aislamiento de T1-Pi muestra características similares a T2-Pi en el día 8 (**Figura 2** y **Figura 3**), con colonias que van desde un color blanco pálido en el borde a gris en el centro, progresivamente se formaron halos de diferentes colores alrededor de un centro de color gris verdoso oscuro cubierto de acérvulos negros que producían masas conidiales de color salmón (día 13). En la parte posterior de las cajas se puede observar la formación de anillos en ambos micelios, que van desde un color gris verdoso oscuro a blanco y muestran el crecimiento del micelio conforme pasan los días.

En el día 8, tanto el aislado NM-SD (**Figura 4**) como RV-Tu (**Figura 5**) y RN-Tu (**Figura 6**) mostraron la formación de micelio aéreo de color gris, además de la formación de halos que van desde un color blanco pálido en el borde a anaranjado grisáceo oscuro en el centro en donde se formaron acérvulos negros acompañados de masas conidiales anaranjadas. En la parte posterior de las cajas Petri se puede observar la formación de anillos, que van desde un color gris verdoso claro en el centro rodeado de un anillo de color salmón que muestra la esporulación y el crecimiento del hongo, La presencia de diferentes tonalidades de gris muestra la variabilidad fenotípica de los aislados de *Colletotrichum* en las regiones muestreadas.

Tabla 5

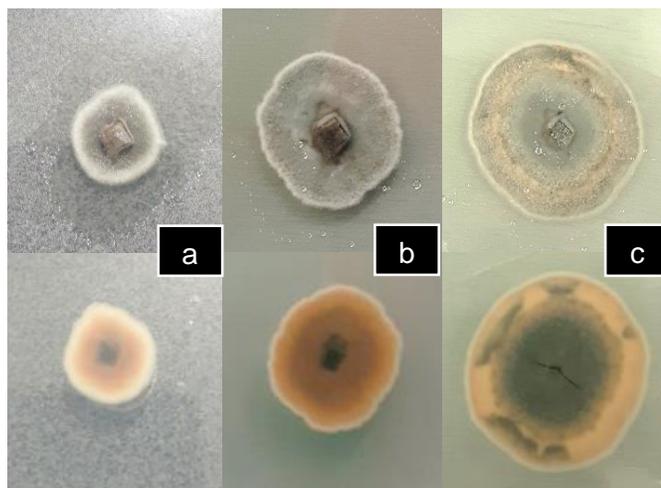
Características macroscópicas de los aislados del agente causante de los síntomas de la antracnosis en frutos de Solanum quitoense Lam. de diferentes zonas del Ecuador.

Código del aislado	Localización	Características macroscópicas		
		Color del centro	Color del margen	Esporulación
T1-Pi	Quito/Pichincha	Gris verdoso oscuro	Blanco	Presente
T2-Pi	Quito/Pichincha	Gris verdoso oscuro	Blanco	Presente
NM-SD	Tandapi/Santo Domingo	Anaranjado grisáceo oscuro	Blanco	Presente
RV-Tu	Baños/Tungurahua	Anaranjado grisáceo oscuro	Blanco	Presente
RN-Tu	Baños/Tungurahua	Anaranjado grisáceo oscuro	Blanco	Presente

Nota Las características corresponden a la vista frontal de los aislados a los 8 días de crecimiento en PDAA.

Figura 2

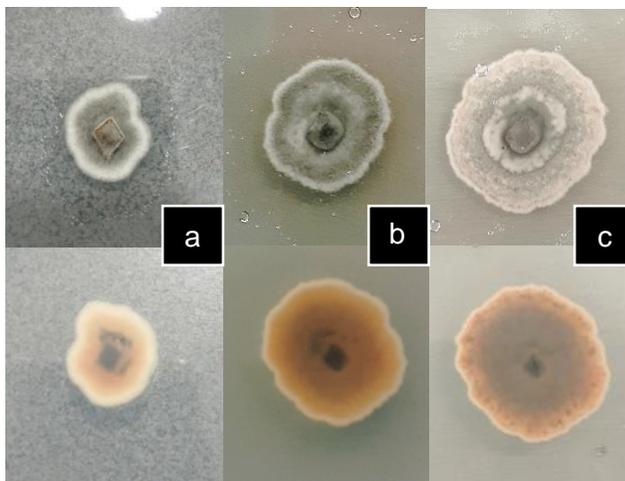
Aislado T1-Pi correspondiente al agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4, 8 y 13 días de crecimiento



Nota El gráfico muestra la vista frontal y posterior del aislado T1-Pi a los a) 4, b) 8 y c) 13, días de ser cultivado en PDAA a 25°C.

Figura 3

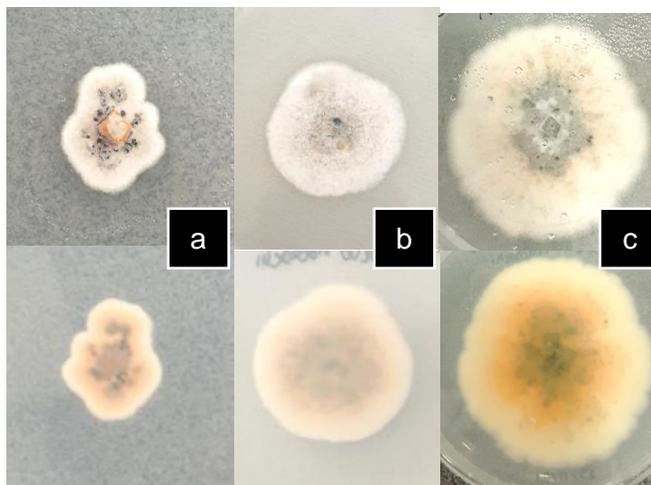
Aislado T2-Pi del agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4, 8 y 13 días de crecimiento



Nota El gráfico muestra la vista frontal y posterior del aislado T2-Pi a los a) 4, b) 8 y c) 13, días de ser cultivado en PDAa a 25°C.

Figura 4

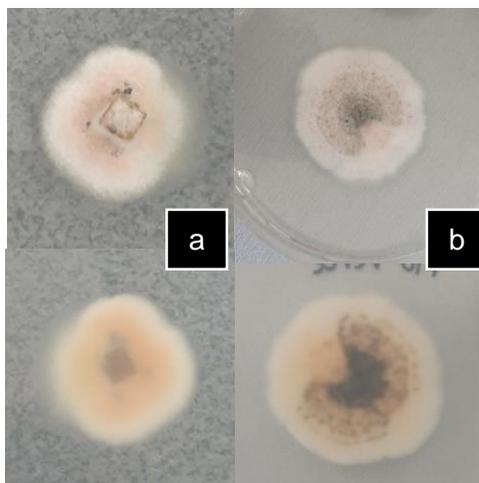
Aislado NM-SD del agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4, 8 y 13 días de crecimiento



Nota El gráfico muestra la vista frontal y posterior del aislado NM-SD a los a) 4, b) 8 y c) 13, días de ser cultivado en PDAa a 25°C.

Figura 5

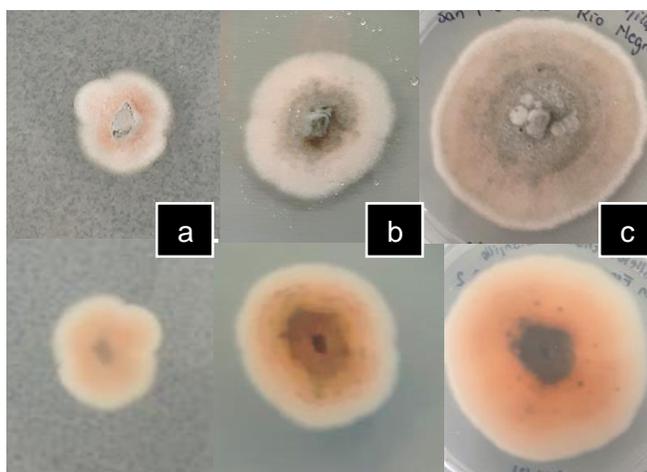
Aislado RV-Tu del agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4 y 8 días de crecimiento



Nota El gráfico muestra la vista frontal y posterior del aislado RV-Tu a los a) 4 y b) 8, días de ser cultivado en PDAa a 25°C.

Figura 6

Aislado RN-Tu del agente causal de los síntomas de la antracnosis a los 4, 8 y 13 días de crecimiento



Nota El gráfico muestra la vista frontal y posterior del aislado RN-Tu a los a) 4, b) 8 y c) 13, días de ser cultivado en PDAa a 25°C.

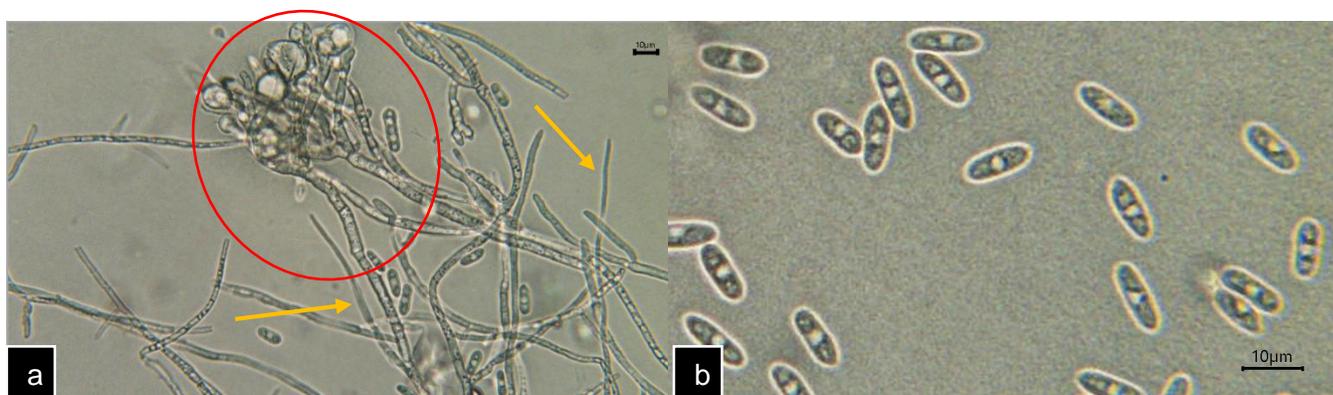
Evaluación microscópica de los aislados monospóricos

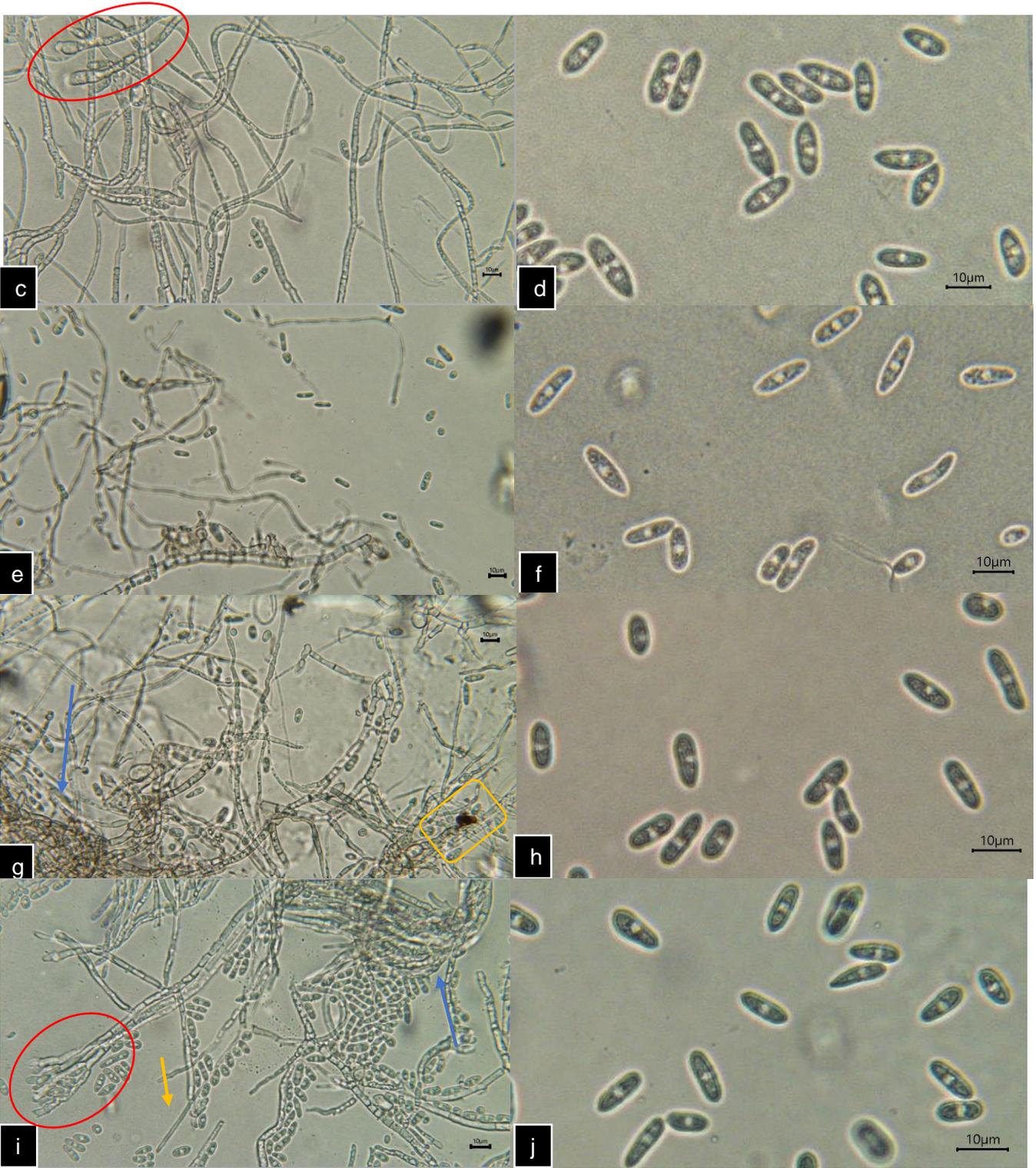
En todos los aislados se pudo observar conidiomas tipo acérvulos contenidos de conidióforos (T1-Pi y RN-Tu) y conidios hialinos. Para la caracterización microscópica se evaluaron 10 conidios de c/aislado.

Se observaron dos tipos de conidios, cilíndricos para los aislados T1-Pi, T2-Pi, RV-Tu y RN-Tu, y fusiformes para NM-SD. Los conidios cilíndricos de los aislados T1-Pi, T2-Pi, RV-Tu y RN-Tu tuvieron ambos extremos ligeramente agudos y con un solo extremo agudo y otro redondeado. Se observó que la mayoría de los conidios fueron hialinos y aseptados, los conidióforos de todos los aislados fueron hialinos, de paredes lisas, en algunos casos ramificados **Figura 7**. Solo para el aislado RV-Tu se pudo observar un apresorio de color marrón. A partir de las mediciones realizadas en el software ImageFocusAlpha se observó que los conidios de T1-Pi están dentro de un rango de $13,597 \pm 1,228 \mu\text{m} \times 5,105 \pm 0,368 \mu\text{m}$, T2-Pi en $15,395 \pm 2,029 \mu\text{m} \times 5,858 \pm 0,554 \mu\text{m}$, NM-SD en $15,666 \pm 1,821 \mu\text{m} \times 5,439 \pm 0,461 \mu\text{m}$, RV en $12,629 \pm 1,629 \mu\text{m} \times 4,629 \pm 0,293 \mu\text{m}$, y RN en $12,719 \pm 1,085 \mu\text{m} \times 4,64 \pm 0,527 \mu\text{m}$, de largo y ancho respectivamente **Tabla 6**. De esta manera, se establece que los conidios de T2-Pi fueron los más anchos, mientras que los conidios de NM-SD fueron los más largos.

Figura 7

Imagen microscópica de los conidios de los aislados del agente causante de los síntomas de la antracnosis en frutos de Solanum quitoense de diferentes zonas del Ecuador.





Nota El gráfico muestra parte del micelio (40X) y los conidios aseptados (100X) correspondientes a los aislados de *Colletotrichum* de diferentes zonas del Ecuador cultivados durante 8 días a 25°C en agar papa dextrosa acidulada (PDAA). a y b T1-Pi (Tumbaco1/Pichincha), c y d. T2-Pi (Tumbaco2/Pichincha), e y f. NM-SD (Nuevo Machachi/Santo Domingo), g y h. RV-Tu (Río Verde/Tungurahua) y i y j RN (Río Negro/Tungurahua). Circulos rojos: conidióforos, cuadro amarillo: apresorio de color marrón, fecha azul: acérvulos y flecha amarilla: setas

Tabla 6

Tamaño y forma de los conidios de los aislados del agente causante de los síntomas de la antracnosis en frutos de Solanum quitoense de diferentes zonas del Ecuador.

Código del aislado	Forma	Largo de los conidios (µm)			Ancho de los conidios (µm)		
		Media	Desv. estándar	Rango	Media	Desv. estándar	Rango
T1-Pi	C, To, Ta	13,597	1,228	12,369 - 14,825	5,195	0,368	4,827 - 5,563
T2-Pi	C, To, Ta	15,395	2,029	13,366 – 17,424	5,858	0,554	5,304 – 6,412
NM-SD	F, To	15,666	1,821	13,845 – 17,487	5,439	0,461	4,978 – 5,899
RV-Tu	C, To, Ta	12,629	1,629	11 – 14,258	4,629	0,293	4,336 – 4,922
RN-Tu	C, To, Ta	12,719	1,085	11,634 – 13,804	4,64	0,527	4,113 – 5,167

Nota F: forma fusiforme, C: forma cilíndrica, To: ambos extremos agudos y Ta: un solo extremo agudo.

La relación entre las medias del largo y ancho de los conidios dio como resultado: 2,617 Ti-Pi, 2,628 T2-Pi, 2,88 NM-SD, 2,73 RV-Tu y 2,74 RN-Tu. Lo que marca la similitud entre T1-Pi con T2-Pi (aislados de Pichincha) y RV-Tu con RN-Tu (aislados de Baños).

Caracterización molecular

Extracción del ADN fúngico

Se midió la concentración y pureza del ADN obtenido mediante el protocolo de extracción de ADN genómico, a partir del Nanodrop 2000. Se pudo observar que todos los extractos tenían una pureza adecuada para ser utilizados en las amplificaciones por PCR, a excepción del extracto de T1-Pi y RV-Tu que mostraban contaminación con sales, carbohidratos o fenoles (A260/230: 0.81 y 1,34, respectivamente). Para las amplificaciones se utilizaron muestras de ADN de aproximadamente 125 ng/μL, por lo que se realizaron diluciones de aquellos extractos con concentraciones superiores. Las concentraciones y valores de pureza se encuentran enlistadas en la **Tabla 7**.

Tabla 7

Valores de concentraciones y pureza de las muestras de ADN de los aislados de Colletotrichum.

Código del extracto	Concentración	A260/A280¹	A260/A230¹
T1-Pi	267,1	1,71	0,81
T2-Pi	1250,6	2,16	2,41
NM-SD	673,4	2,08	2,42
RV-Tu	424,4	2,05	1,34
RN-Tu	1186,8	2,17	2,47

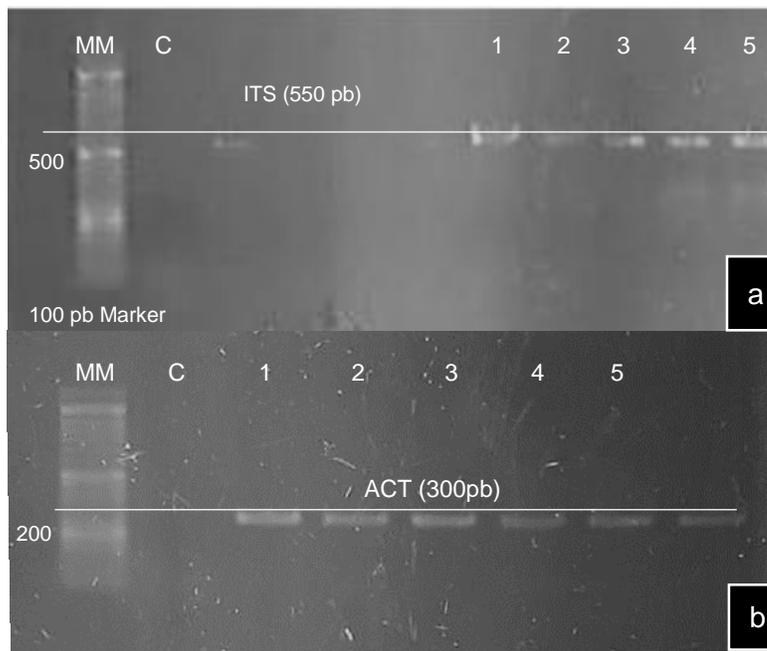
Nota ¹ Los valores óptimos de A260/280 es >1.8 - 2.1 y de A260/A230 es >2 - 2,2

Amplificación por PCR y secuenciación

Se obtuvieron amplicones de los fragmentos ITS y ACT con tamaños idénticos para todos los aislamientos, tales como: 550 pb para ITS (Damm et al., 2012) y 316 pb para la región de ACT (Caicedo et al., 2017). Los amplicones se verificaron por electroforesis **Figura 8**.

Figura 8

Electroforesis en gel de agarosa 4% de los amplicones de ITS y ACT de las muestras de ADN de los aislados de Colletotrichum.



Nota El gráfico muestra los amplicones de ITS (a) y ACT (b), donde MM: marcador molecular, C: control negativo, 1: T1-Pi, 2: T2-Pi, 3: NM: SD, 4: RV-Tu y 5: RN-Tu

Todos los aislamientos generaron amplicones de los siguientes tamaños: 550 pb para ITS y 300 pb para ACT. No se observaron amplicones en los controles negativos (agua).

Análisis Blast

Las secuencias obtenidas para cada aislado fueron ensambladas y editadas en BioEdit **Anexo 2**. A partir de ello se obtuvieron secuencias parciales de ACT de 245 pb para todos los aislados. Al ser comparadas con la base de datos de GenBank con la herramienta Blast del NCBI, no se alinearon al 100% con ninguna secuencia existente. En cambio, se encontró un 99,59% de identidad con *Colletotrichum costaricense* CBS: 330.75 (N° accesión: JQ949501.1) para los cinco aislados **Anexo 3**.

En el caso de la región ITS se obtuvieron secuencias de 540 pb para todos los aislados del estudio, conformadas por el intrón ITS1 (1-192pb), gen de ARNr 5.8S (193-350pb), intrón ITS2 (351-505pb) y parte del gen de ARNr 28S (506-540pb) (Guamán y Caicedo, 2018); con la diferencia de que NM-SD, RV-Tu y RN-Tu presentaron dos mutaciones (transiciones) en la posición 498 (T por C) y 499 (C por T), región del intrón ITS2. Estas secuencias mostraron porcentajes variables de 99% de identidad con diferentes especies de *Colletotrichum*, como: *C. scovillei* CBS 126529 (NR_111737.1), *C. melonis* CBS: 159.84 (NR_111734.1), *C. cuscutae* IMI 304802 (NR_111735.1), *C. indonesiense* CBS 127551 (MH864562.1), *C. limetticola* CBS: 114.14 (JQ948193.1), *C. eriobotryae* GLMC 1935 (NR_171181.1), *C. sloanei* IMI 364397 (NR_111743.1), *C. guajavae* IMI 350839 (NR_111738.1), *C. costaricense* CBS: 330.75 (NR_111731.1), *C. miaoliense* NTUCC 20-001-1 (NR_171190.1), *C. tamarilloi* CBS: 129814 (NR_111732.1), *C. cosmi* CBS 853.73 (NR_111739.1) y *C. acutatum* CBS 112996 (NR_144794.1).

Las secuencias previamente mostradas se basan en los especímenes físicos utilizados como ejemplares de las especies correspondientes (sequences from type material) (Federhen, 2015).

Debido a la existencia del estudio de Dávila et al. (2018) en que se secuenció la región ITS de aislados de *Solanum quitoense* Lam. para la identificación de hongos del género *Colletotrichum*, se procedió a comparar con las secuencias obtenidas en dicho estudio: *Colletotrichum* sp. L5N4 (MF185318.1), L5N29 (MF185323.2) y L5N80 (MF185335.2). Las secuencias de ITS de T1-Pi, T2-Pi, NM-SD, RV-Tu y RN-Tu presentaron un porcentaje de identidad de 99,81%, 99,81%, 99,26%, 99,26% y 99,26% con *Colletotrichum* sp. L5N4 y L5N29, respectivamente. Mientras que con L5N80 mostraron porcentajes de identidad de 99,45%, 99,45%, 98,89%, 98,89% y 98,89%. Además de ello, se comparó con las secuencias de ITS y ACT de *Colletotrichum* sp. de

Solanum betaceum identificadas por Guamán y Caicedo (2018): Is-Ch-Pi (MG451868.1; MG451841.1), Is-Cu-Pi (MG451869.1; MG451842.1), Is-Qui-Pi (MG451870.1; MG451843.1), Is-Mi-Pi (MG451871.1; MG451844.1), Is-Uy-Pi (MG451872.1; MG451845.1) y Is-Az-Pi (MG451873.1; MG451846.1). En el caso del análisis de homología con la región ITS de todos los aislados de *Colletotrichum* sp., se obtuvieron porcentajes de identidad de 99,44% para RV-Tu, RN-Tu y NM-SD; y 99,81% para T1-Pi y T2-Pi; mientras que para la región ACT, se encontró un 99,19% de identidad con de los aislados de este estudio con *Colletotrichum* sp.

Análisis filogenético

Al no tener clara la identidad de los cinco aislados, se decidió hacer un análisis filogenético para identificar especies que estén relacionadas. Para ello se utilizaron las secuencias de *Colletotrichum* sp. L5N4, L5N29 y L5N80 del estudio de Dávila et al. (2018), *Colletotrichum* sp. Is-Cu-Pi, Is-Uy-Pi, Is-Quin-Pi, Is-Mi-Pi, Is-Az-Pi y Is-Ch-Pi de Guamán y Caicedo (2018), junto a 11 secuencias de especies del complejo *C. acutatum*, 3 del complejo *C. gloeosporoides* y un grupo externo.

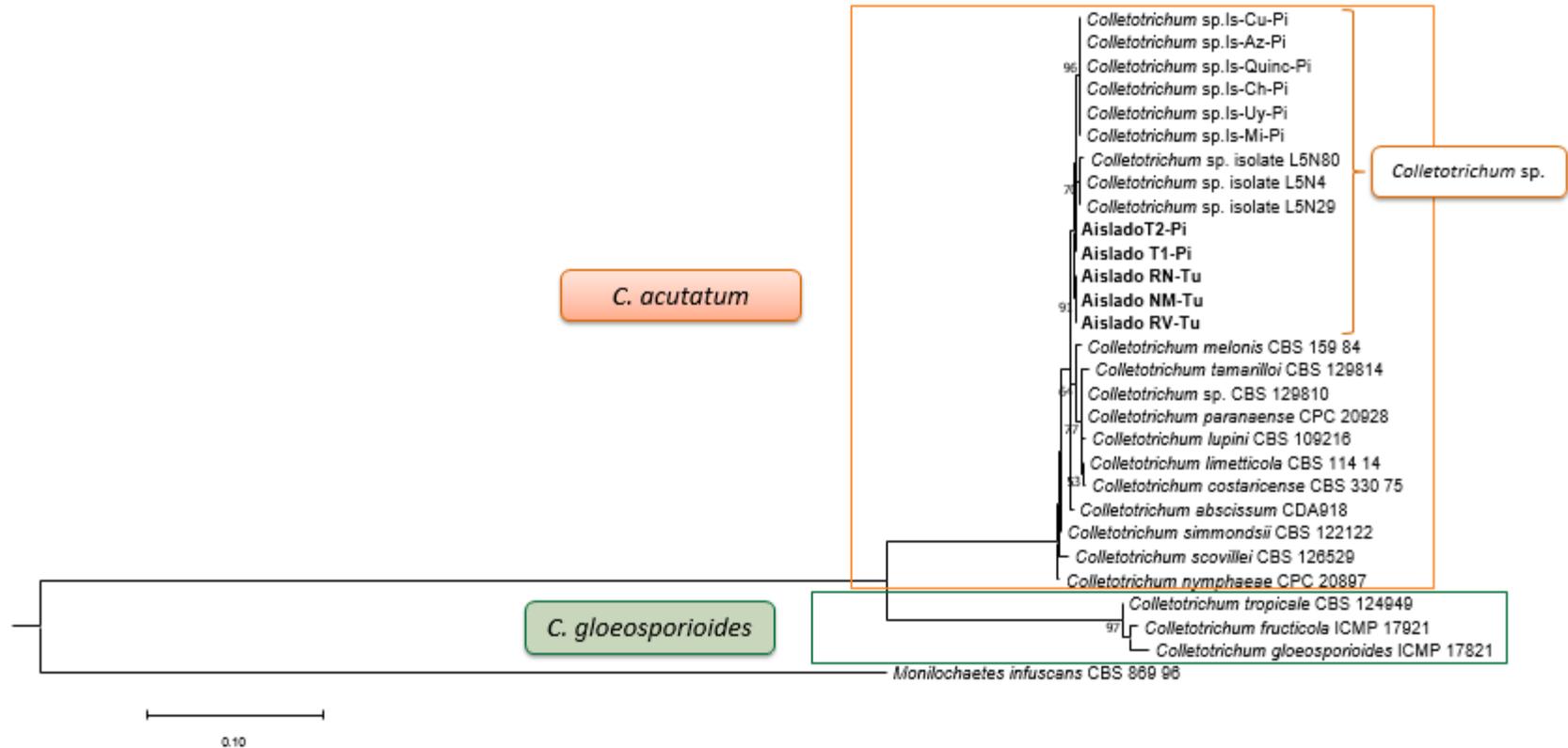
Así se obtuvo un árbol de máxima verosimilitud **Figura 9**, en el que los aislados T1-Pi, T2-Pi, NM-SD, RV-Tu y RN-Tu tienen una distancia genética más corta con especies del complejo *C. acutatum*, y una distancia más larga con especies del complejo *C. gloeosporoides*.

Las secuencias concatenadas de ITS y ACT utilizadas en el análisis molecular multilocus, ubican a los aislados de este estudio dentro del clado 1 del complejo *C. acutatum*, mismo que comprende especies estrechamente relacionadas que se encuentran en varios huéspedes en América central y del sur. A pesar de que los valores de soporte del árbol son bajos, se observa la cercanía de los cinco aislados con *Colletotrichum* sp. que afecta a tomate de árbol y a hojas de naranjilla, sin embargo no forman parte del mismo clado.

Con todo lo expuesto se sugiere que los cinco aislados podrían ser una nueva especie de *Colletotrichum* que afecta únicamente a naranjilla. Sin embargo, para obtener un árbol más robusto hacer falta secuenciar otros genes como GADPH, TUB2, HIS3 y CHS-1.

Figura 9

Árbol filogenético multilocus (ITS y ACT) obtenido a partir del método de máxima verosimilitud



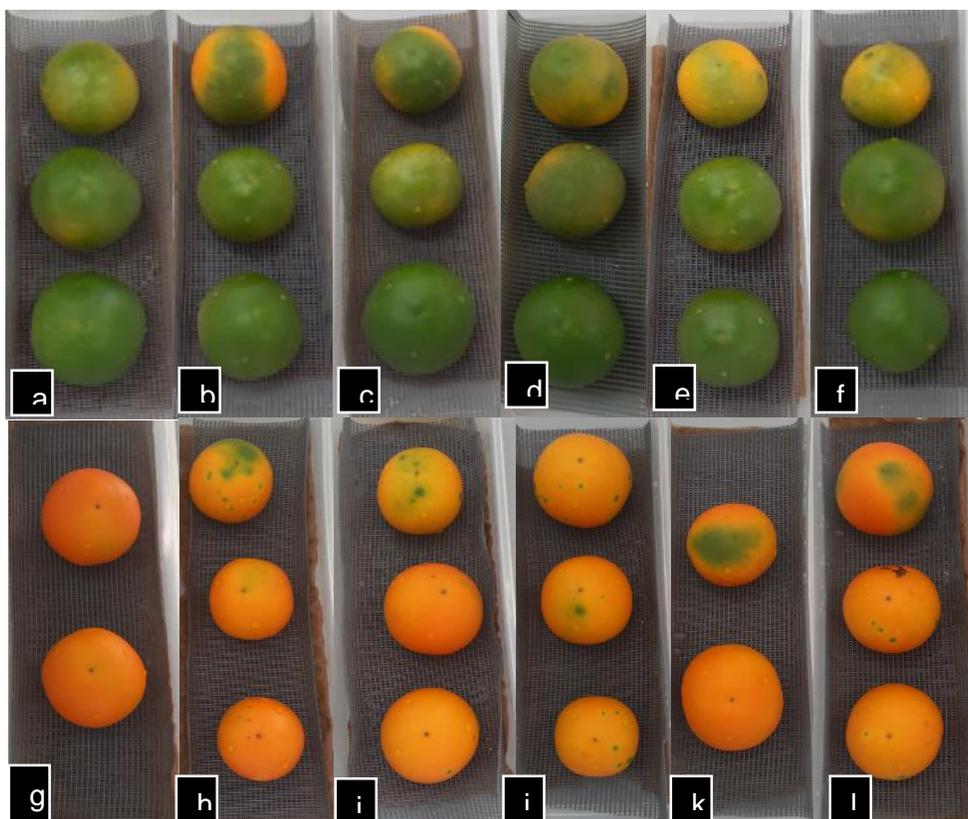
Nota El árbol se elaboró a partir de secuencias concatenadas de genes de ITS y ACT. Se utilizó las secuencias de *Monilochaetes infuscans* CBS 869 96 como grupo externo. Los valores de soporte se muestran en los nodos y la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

Postulados de Koch (Test de patogenicidad)

Debido a que *Colletotrichum* es un género de hongos que infecta pre-cosecha y post-cosecha, se utilizaron frutos maduros e inmaduros de *Solanum quitoense* Lam. var. *quitoense* para comprobar los postulados de Koch **Figura 10**. Para ello se inoculó aproximadamente 1×10^6 conidios/mL de todos los aislados de *Colletotrichum* en los frutos inmaduros y 1×10^5 conidios/mL en los frutos maduros mediante una punción con una jeringa Hamilton en los frutos inmaduros, y se analizaron los resultados 7 días después de la inoculación.

Figura 10

Frutos sanos de *Solanum quitoense* Lam. var. *quitoense* el día 0 de la inoculación con los aislados de *Colletotrichum* sp.



Nota El gráfico representa los frutos sanos de *Solanum quitoense* Lam. var. *quitoense*, inmaduros e maduros, el día 0 de la inoculación con los aislados de *Colletotrichum*. a y g. control, b y h. T1-Pi, c e i. T2-Pi, d y j. NM-SD, e y k. RV-Tu, y f y l. RN-Tu.

Todos los aislados de este estudio (T1-Pi, T2-Pi, NM-SD, RV-Tu y RN-Tu) provocaron las lesiones comunes de la antracnosis en los frutos inmaduros de naranjilla (**Figura 11**). Los síntomas observados consistieron en lesiones circulares ligeramente hundidas de color marrón con un centro negro cubierto de masas conidiales de color anaranjado/salmón (T1-Pi y T2-Pi) o de micelio blanco con conidios anaranjados (NM-SD, RV-Tu y RN-Tu). No se observaron lesiones en los frutos control inoculados con agua destilada. Sin embargo, los frutos maduros no mostraron la aparición de síntomas durante todo el tiempo de análisis, a excepción de RV-Tu que produjo las lesiones necróticas.

Figura 11

Frutos de Solanum quitoense Lam. var quitoense el día 7 de la infección con los aislados de Colletotrichum sp.



Nota El gráfico muestra los frutos inmaduros y maduros de *Solanum quitoense* Lam. var *quitoense* el día 7 de la inoculación con los aislados de *Colletotrichum* sp.. a y g. control, b y h. T1-Pi, c e i. T2-Pi, d y j. NM-SD, e y k. RV-Tu, y f y l. RN-Tu,

El número de síntomas (lesiones necróticas) y signos (micelio blanco o masas conidiales naranjados-esporulación) que produjeron cada uno de los aislados en frutos maduros e inmaduros de naranjilla hasta el día 7, se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 8

Postulados de Koch: número de síntomas y signos de la antracnosis en frutos maduros e inmaduros de naranjilla tras ser inoculados con los aislados de Colletotrichum sp.

Síntomas y signos	Frutos inmaduros						Frutos maduros					
	C	T1- Pi	T2- Pi	NM- SD	RV- Tu	RN- Tu	C	T1- Pi	T2- Pi	NM- SD	RV- Tu	RN- Tu
Síntomas	0	9	9	9	9	9	0	0	1	2	6	0
Signos	0	7	8	4	7	9	0	0	0	0	0	0

Nota C: control negativo o frutos inoculados con agua destilada

Con todo lo expuesto, se confirma que los frutos inmaduros logran mostrar síntomas de la antracnosis debido a que la cantidad del inóculo fue igual o mayor a 1×10^6 conidios/mL. Contrario a lo observado en los frutos maduros, en los que no se observaron signos o síntomas, debido a que la cantidad del inóculo fue menor al 1×10^6 conidios/mL, por lo que hubo un error en la preparación de la solución de esporas.

Adicionalmente, se realizó la medición de los diámetros de las lesiones de color marrón de cada uno de los frutos inmaduros de naranjilla infectados por los aislados de *Colletotrichum* sp. **Tabla 9.** A partir del aislado T2-Pi se registraron diámetros de lesiones de 1,410 – 3,013 cm, siendo estos los más altos en comparación con el resto de aislados, lo que indica que esta especie es la más agresiva; seguida de RV-Tu con diámetros entre 1,294 – 2,409 cm, T1-Pi con 0,867 – 2,705 cm y RN-Tu con 1,293 –

2,271 cm. Por el contrario, el aislado de NM-SD resultó ser el menos agresivo, pues formó lesiones necróticas de menor tamaño, con diámetros que van entre 0 a 1,777 cm.

Estos resultados fueron confirmados con un análisis de varianza ANOVA del diámetro de la lesión. Estadísticamente al menos un par de los aislados es diferente significativamente con respecto a la patogenicidad (valor-p: 0,0076 menor a 0,05 y se rechaza la Ho) **Tabla 10**. Esto se comprobó a partir de una prueba de Tuckey y LSD, en las que se resolvió que el aislado T2-Pi es el más patogénico, contrario a NM-SD que es el menos patogénico **Tabla 11**.

Tabla 9

Diámetros en cm de las lesiones de color marrón de los frutos inmaduros de naranjilla infectados con los aislados de Colletotrichum sp.

	T1-Pi	T2-Pi	NM-SD	RV-Tu	RN-Tu
Diámetros en cm	2,125	2,880	1,760	1,725	1,225
	2,425	3,075	2,265	2,275	1,510
	2,710	2,840	1,970	2,635	2,780
	2,145	1,935	0,095	1,890	1,835
	2,045	2,450	0,055	2,215	2,135
	2,770	2,710	0,075	2,180	1,730
	0,400	0,700	1,110	1,215	1,910
	0,915	2,030	0,060	1,685	1,160
	0,545	1,290	0,090	0,850	1,760
Media	1,786	2,212	0,831	1,852	1,782
Desviación estándar	0,919	0,801	0,946	0,558	0,489
Rango	0,867 –	1,410 –	0 – 1,777	1,294 –	1,293 –
	2,705	3,013		2,409	2,271

Tabla 10

ANOVA de los diámetros de lesión en los frutos inmaduros de naranjilla infectados con los aislados de Colletotrichum sp.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor-p
Aislados	9,49	4	2,37	4,05	0,0076
Error	23,45	40	0,59		
Total	32,94	44			

Nota la variación total de 45 datos fue de 32,94; de esta cantidad, 9,49 se atribuye a las diferencias entre los aislados y 23,45 a las diferencias entre las mediciones de los diámetros de lesión de cada aislado. Al ponderar esto con los grados de libertad, se obtienen el valor real de cada fuente de variabilidad; las diferencias debido a cada aislado es de 2,37 y el error es de 0,59, 4 veces más pequeña que la primera; lo que indica que las diferencias observadas entre los cinco aislados son significativas y no se deben al error experimental. Además $F_0 = 4.05$ es mayor a $F_{0.05,4,40} = 2.606$ y se rechaza la H_0 .

Tabla 11

Evaluación de la patogenicidad de los cinco aislados de Colletotrichum sp. a partir de la prueba estadística de Tuckey y LSD

Aislados	Medias	n	E.E.	Tuckey	LSD
T2-Pi	2,21	9	0,26	A	A
RV-Tu	1,85	9	0,26	A B	A
T1-Pi	1,79	9	0,26	A B	A
RN-Tu	1,78	9	0,26	A B	A
NM-SD	0,83	9	0,26	B	B

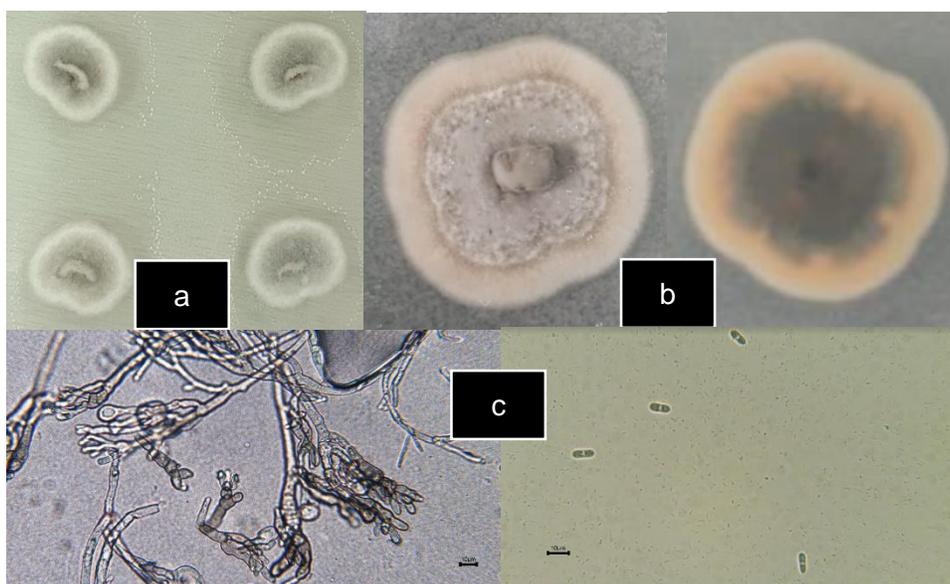
Nota Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Finalmente, con el fin de cumplir el cuarto postulado de Koch, se reisoló el agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en un nuevo medio PDAA. Las **Figura 12-17** muestran los aislamientos obtenidos de las lesiones necróticas de los frutos inmaduros previamente infectados con los aislados. Se observa que las características macro y microscópicas de las colonias son similares a los aislamientos

iniciales. En todos los aislados se observaron conidióforos hialinos dispuestos en acérvulos y conidios hialinos. T1-Pi, T2-Pi, RV-Tu y RN-Tu presentaron conidios cilíndricos con ambos extremos agudos o con un solo extremo agudo y otro redondeado y en NM-SD se observaron conidios fusiformes.

Figura 12

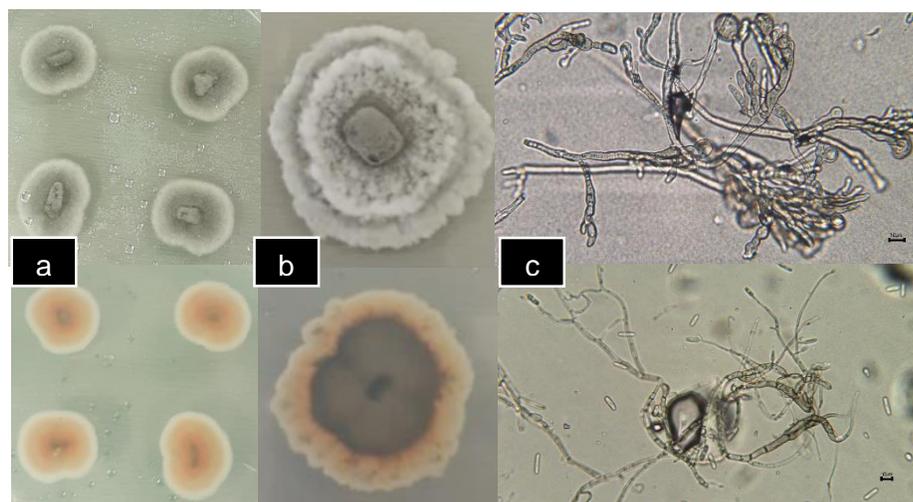
Postulados de Koch: reaislado de T1-Pi de frutos de naranjilla inmaduros



Nota El gráfico muestra las características macro y microscópicas del aislado T1-Pi correspondiente a *Colletotrichum* sp. a) vista frontal de reaislados a partir del fruto (4 días), b) vista frontal y posterior de los cultivos purificados de los reaislados a los 13 días de ser cultivado en un nuevo medio PDAA a 25°C, c) conidióforos y conidios (40X).

Figura 13

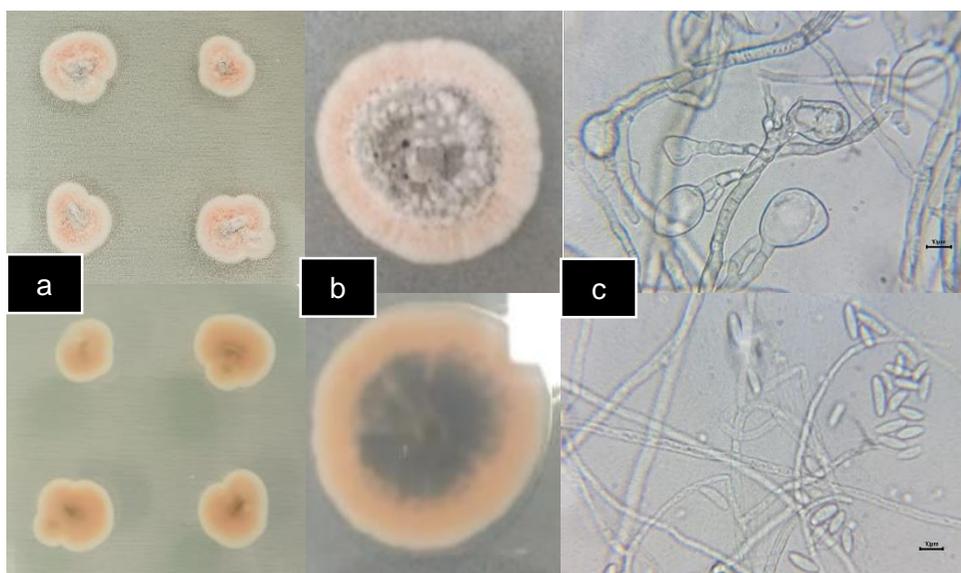
Postulados de Koch: reislado de T2 -Pi de frutos de naranjilla inmaduros



Nota El gráfico muestra las características macro y microscópicas del aislado T2-Pi correspondiente a *Colletotrichum* sp. a) vista frontal de reislados a partir del fruto (4 días), b) vista frontal y posterior de los cultivos purificados de los reislados a los 13 días de ser cultivado en un nuevo medio PDAA a 25°C, c) conidióforos y conidios (40X).

Figura 14

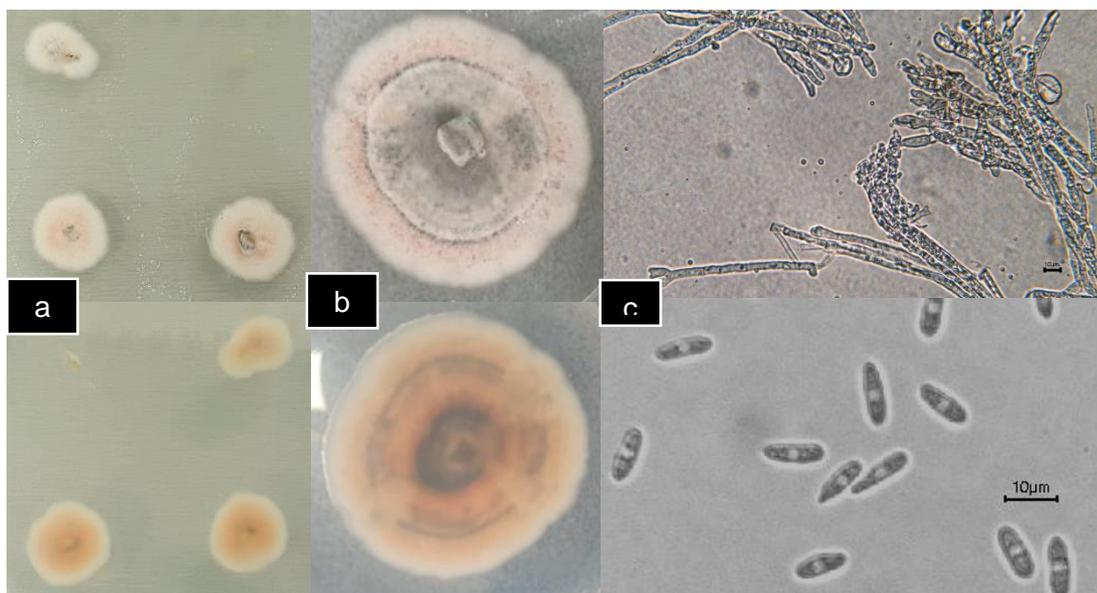
Postulados de Koch: reislado de NM-SD de frutos de naranjilla inmaduros



Nota El gráfico muestra las características macro y microscópicas del aislado NM-SD de *Colletotrichum* sp. a) vista frontal de reislados a partir del fruto (4 días), b) vista frontal y posterior de los cultivos purificados de los reislados a los 13 días de ser cultivado en un nuevo medio PDAA a 25°C, c) conidióforos y conidios (100X).

Figura 15

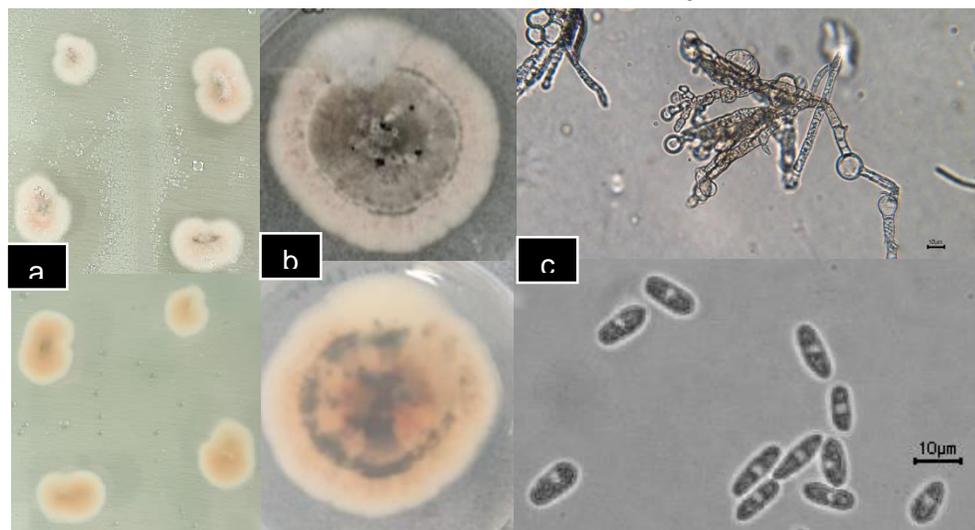
Postulados de Koch: reislado de RV-Tu de frutos de naranjilla inmaduros



Nota El gráfico muestra las características macro y microscópicas del aislado RV-Tu de *Colletotrichum* sp. a) vista frontal de reislados a partir del fruto (4 días), b) vista frontal y posterior de los cultivos purificados de los reislados a los 13 días de ser cultivado en un nuevo medio PDAA a 25°C, c) conidióforos (40X) y conidios (100X).

Figura 16

Postulados de Koch: reislado de RN-Tu de frutos de naranjilla inmaduros



Nota El gráfico muestra las características macro y microscópicas del aislado RN-Tu de *Colletotrichum* sp. a) vista frontal de reislados a partir del fruto (4 días), b) vista frontal y posterior de los cultivos purificados de los reislados a los 13 días de ser cultivado en un nuevo medio PDAA a 25°C, c) conidióforos (40X) y conidios (100X).

Capítulo V: Discusión

Este estudio es el primero que ha tenido como objetivo identificar y caracterizar al agente fitopatógeno causante de los síntomas comunes de la antracnosis en frutos de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) a partir de un análisis macroscópico, microscópico y molecular. Además se realizaron los postulados de Koch con el fin de comprobar que los aislados corresponden al agente causal de la antracnosis.

Recolección de los frutos

Los aislados trabajados en este estudio fueron obtenidos a partir de observación de la sintomatología común de la antracnosis en las tomas de muestras en campo. Tal como lo muestra la **Figura 1** los síntomas comunes se asocian con lo reportado por Montes et al. (2010), quienes lo describieron como lesiones redondeadas y hundidas con un centro de color naranja o salmón (esporas del hongo) inicialmente son de color marrón y conforme crecen se tornan de color negro hasta que llegan a cubrir todo el fruto, causando su inmediata deformación y caída. Jarrín (2009) menciona que pueden existir una o varias lesiones en un mismo fruto, que provocan que su tejido interno entre en un proceso de necrosamiento.

Los hongos del género *Colletotrichum* provocan las lesiones necróticas en frutos debido a que pueden producir cuatro enzimas hidrolíticas: poligalacturonasas, pectinaliasas y proteasas que degradan los carbohidratos y provocan la disolución de la pared celular, y las cutinasas capaces de hidrolizar las cutículas ocasionando un daño directo al pericarpio del fruto (Bailey et al., 1992, citado en Wharton & Diéguez, 2004).

Las especies de *Colletotrichum* son patógenos latentes que pueden infectar tejidos vegetales sanos sin provocar síntomas (endófito) pero puede modificar su rol ecológico debido al estrés ambiental, como altos niveles de humedad, calor, falta de nutrientes (Dávila et al., 2018). *Colletotrichum* sp. se desarrolla cuando existen cambios bruscos de clima, como el paso de un tiempo lluvioso a tiempo seco o al contrario, o

específicamente en zonas lluviosas donde la temperatura va entre 17.5° y 19°C con 90% de humedad relativa (Montes et al., 2010), lo que se relaciona con las zonas de donde fueron recogidas las muestras, pues Río Verde y Río Negro (Tungurahua) tienen temperaturas máximas de 18° y 16,8 °C y humedad de 90,51% y 90,30%, respectivamente (Climate-Data, s.f.) , Nuevo Machachi (Santo Domingo) con una temperatura promedio de 17,56° con precipitaciones de 2700 mm/año (Jarrín, 2009) y Tumbaco con una temperatura promedio anual de 17,2°C y 75,2% de humedad relativa (INAMI, s.f. citado en Ponce, 2013).

A partir de la toma de muestras se obtuvo un total de 5 aislamientos del agente causal asociado a los síntomas de la antracnosis en naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

Caracterización morfológica

Los reportes de Jarrín (2009), Montes et al. (2010) y Revelo et al. (2010) confirman que la antracnosis en naranjilla es a causa del hongo *C. gloeosporioides*; contrario a los reportes de Ochoa et al. (2010) quienes confirman que la enfermedad es originada por *C. acutatum*. A partir de ello, se utilizan las características morfológicas macro y microscópicas para delimitar el complejo de los aislados utilizados en este estudio.

Evaluación macroscópica de los aislados monospóricos

De todos los aislados obtenidos, se observó que en la parte frontal existía un cambio de color, de tonalidades más claras a diferentes tonalidades de gris en el centro de los micelios, siendo el anaranjado grisáceo oscuro el predominante en las muestras de las provincias de Santo Domingo y Tungurahua; contrario a lo observado en las muestras de Pichincha en las que el tono significativo era el gris verdoso oscuro. Mientras que en la parte reversa, todos los aislados presentaban centros de color gris, rodeados de un anillo anaranjado. La descripción macroscópica de los aislados coincide

con las observaciones reportadas para especies del complejo *C. acutatum* que infectan otras solanáceas, como *S. betaceum* (Damm et al, 2012; Falconi et al., 2013; Caicedo et al., 2017; Guamán y Caicedo, 2018) en los que las colonias cambian de blanco a diferentes tonalidades de gris. Estos resultados muestran la variabilidad fenotípica de los hongos *Colletotrichum* en las tres zonas muestradas, lo que concuerda con Nirenberg et al. (2002) quienes relacionaron la variabilidad fenotípica con la preferencia de los hongos en huéspedes de regiones geográficas específicas, o también podría ser por la aplicación continua de fungicidas sistémicos. Además de ello, Guamán (2018) explica que al existir cambios de temperatura y de medio de los aislados pueden aparecer alteraciones en la morfología del patógeno, por lo que resulta de gran importancia complementar con estudios moleculares para confirmar la especie de *Colletotrichum*.

A pesar de que ninguno de los aislados llegó a identificarse con una especie de *Colletotrichum*, sus características fenotípicas o macroscópicas son propias del complejo de especies de *C. acutatum* (Damm et al 2012).

Evaluación microscópica de los aislados monospóricos

La forma de los extremos de los conidios permite marcar una diferencia entre los aislados del complejo de especies *C. gloeosporoides* y *C. acutatum*. El complejo *C. gloeosporoides* presenta conidios con ambos extremos redondeados, mientras que *C. acutatum* genera conidios con un solo extremo redondeado y el otro agudo, o ambos extremos agudos (Oliveria et.al, 2005; Falconí, 2013). En este estudio, los conidios de aislados de Pichincha y Tungurahua fueron cilíndricos con extremos agudos y un solo extremo agudo. Mientras que los conidios de NM-SD eran fusiformes con ambos extremos agudos. Estos resultados sugieren que los aislados trabajados en este estudio son del complejo de especies de *C. acutatum*.

Las especies del complejo *C. acutatum* bajo el microscopio tiene algunas estructuras como: apresorios, conidios aseptados formados de los conidiomas tipo acérvulo, setas (se observa su punta), conidióforos, células conidiógenas y en ciertos casos esclerocios (Damm et al., 2012). En todos los aislados de este estudio se observaron conidióforos hialinos, de paredes lisas y ramificados formados de conidiomas acervulares (RV-Tu y RN.Tu) y de hifas (T1-Pi y T2-Pi), células conidiogénicas hialinas y cilíndricas, hifas vegetativas hialinas, de paredes lisas, septadas y ramificadas, además de conidios de diferentes formas y tamaños. Oliveira et al. (2005) consideran que una estructura importante para la diferenciación de las especies de *Colletotrichum* son los apresorios formados a partir de la germinación de los conidios, en los que se considera dos aspectos importantes: forma y color. Sin embargo, en este estudio no se realizó el proceso de germinación de conidios, por lo que se recomienda que en futuras investigaciones se tome en cuenta esta caracterización de apresorios, debido a que son estructuras muy conservadas dentro de cada especie (Caicedo et al, 2017).

A partir de los datos obtenidos sobre las medidas de ancho y largo de los conidios, se encontró que los aislados T1-Pi, T2-Pi y NM-SD no tuvieron ninguna similitud con especies de *Colletotrichum* ya documentadas en Damm et al. (2012) debido a que ninguna especie registrada presentaba anchos $\geq 5 \mu\text{m}$. RV-Tu con conidios de $12,6 \pm 1,6 \times 4,6 \pm 0,3$ y RN-Tu con conidios de $12,7 \pm 1,1 \times 4,6 \pm 0,5$ tienen similitud con los conidios de *C. simmondsii* CBS 294.67 ($12,3 \pm 1,8 \times 4,0 \pm 0,4$), con *C. lupini* IMI 375715 ($12,8 \pm 3,3 \times 4,3 \pm 0,6$), *C. acutatum* CBS112761 ($12,7 \pm 2,7 \times 4,1 \pm 0,5$) y *C. melonis* CBS 159.83 ($12,8 \pm 3,6 \times 3,9 \pm 0,4$) (Damm et al, 2012). Además, Caicedo et al. (2017) menciona que dichas especies del complejo de *C. acutatum* tienen conidios con forma y tamaño similar a los de *C. tamarilloi*.

Sin embargo, estos resultados requieren de la caracterización molecular para confirmar que la especie de *Colletotrichum* es específica de naranjilla; pues las características macro y microscópicas por sí solas no permiten identificar diferencias en las especie del complejo, además que este tipo de características van de la mano con la región y huésped de donde se obtuvieron los aislados y de las condiciones de cultivo para el crecimiento del hongo (Caicedo et al, 2017; Castro et al, 2019).

Caracterización molecular

El árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido a partir del análisis molecular multilocus de las regiones ITS y ACT dio como resultado que todos los aislados del estudio no pertenecen a ninguna de las especies tipo de *Colletotrichum* registradas en el Banco Mundial de Genes (GenBank), sin embargo, fueron agrupadas dentro de uno de los clados del complejo de especies *Colletotrichum acutatum*, rechazando aquellos reportes que confirmaban a *C. gloeosporoides* como el agente causal de antracnosis en *Solanum quitoense* Lam (Jarrín, 2009; Montes et al. 2010; Revelo et al. 2010).

En este estudio solo se utilizaron las secuencias de la región ITS y ACT para identificar la especie de cada uno de los aislados y posteriormente realizar el árbol filogenético. Por un lado, la región ITS es el barcode universal de hongos pues permite identificar especies de hongos a partir de un análisis de las distancias genéticas (Scoch et al, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que la región ITS por sí sola tiene bajo poder de resolución para identificar y diferenciar las especies del género *Colletotrichum*, pues los árboles filogenéticos generados a partir las secuencias ITS suelen estar mal respaldados por los valores de soporte de los nodos y cerca del 10% de los aislados suelen ubicarse incorrectamente (Crouch et al., 2009; Dávila et al., 2018).

El reconocimiento de especies del complejo de *C. acutatum* se puede dar a partir del análisis individual de los genes: gen ribosómico nuclear 5.8S con los dos

espaciadores transcritos internos (ITS), ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH, HIS3, CAL, GS; siendo TUB2 y GAPDH los que funcionan mejor, e ITS y CHS-1 los que reconocen un menor número de especies (Damm et al. 2012; Da Silva, 2020). Damm et al. (2012) realizaron una de las investigaciones con más especies del complejo *Colletotrichum acutatum* identificadas en diferentes huéspedes, y son ellos quienes recomiendan utilizar un análisis filogenético molecular multilocus (MLSA) a partir de las secuencias combinadas de TUB2 y GAPDH para obtener una identificación más confiable sobre especies previamente reconocidas y no reconocidas. En base a ello, se observa que la información de las regiones ITS y ACT obtenida en este estudio no fue suficiente para lograr la identificación de la especie del *Colletotrichum* en ninguno de los aislados, por lo que, se recomienda ampliar el análisis de homología y filogenético a partir de los genes faltantes.

Dentro de los resultados de este estudio se pudo observar que ninguno de los aislados pertenecía a una especie de *Colletotrichum* previamente descrita. A pesar de ello, se agruparon cerca de *Colletotrichum* sp. L5N4 (MF185318.1), L5N29 (MF185323.1) y L5N80 (MF185335.1), aislados obtenidos en la Amazonía ecuatoriana que atacan específicamente hojas de *Solanum quitoense* Lam. (Dávila et al. 2018); y de *Colletotrichum* sp. Is-Ch-Pi (MG451868.1; MG451841.1), Is-Cu-Pi (MG451869.1; MG451842.1), Is-Qui-Pi (MG451870.1; MG451843.1), Is-Mi-Pi (MG451871.1; MG451844.1), Is-Uy-Pi (MG451872.1; MG451845.1) y Is-Az-Pi (MG451873.1; MG451846.1) obtenidos de frutos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) específicamente de Pichincha (Guamán y Caicedo; 2018). Lo que podría sugerir que existe un gran potencial de que sean parte de una nueva especie de *Colletotrichum* que afecta a plantas de *Solanum quitoense* Lam. y *Solanum betaceum*.Cav., diferente a *Colletotrichum tamarilloi*. Sin embargo, esta suposición debería ser comprobada con un estudio más exhaustivo que utilice un MLSA con todos los genes útiles para

complementar la caracterización molecular e identificar la especie del complejo de *C. acutatum*, sobre todo con GAPDH y TUB2 (Damm et al. 2012).

Postulados de Koch

Las pruebas realizadas permitieron comprobar que los aislados de T1-Pi, T2-Pi, NM-SD, RV-Tu y RN-Tu son el agente causal de la enfermedad de la antracnosis en frutos de naranjilla, debido a que los síntomas mostrados como: las lesiones necróticas acompañadas de micelio algodonoso sobre la zona de infección y masas de esporas de color salmón, coinciden con lo descrito por Montes et al. (2010) y Arrieta et al. (2010).

Los resultados obtenidos a los 7 días de observación, permitieron confirmar que los aislados del estudio provocaron la aparición de síntomas en los frutos inmaduros, contrario a lo sucedido en los frutos maduros, los cuales no presentaron los síntomas comunes de la antracnosis. Prusky et al. (2000) confirma que las especies de *Colletotrichum* tienen la capacidad de atacar tanto frutos en desarrollo (pre-cosecha) como frutos maduros (post-cosecha o almacenamiento); es así que, Arrieta et al. (2010) demostraron dicha confirmación a partir de la inoculación de una suspensión de 1×10^6 conidias/mL de *Colletotrichum acutatum* a frutos de naranjilla en tres estados de madurez (pintón, maduro y verde) obteniendo como resultado que los frutos más afectados son aquellos en estado verde y maduro, mientras que los pintones son los menos afectados después de 3 días de la inoculación. Estos resultados coinciden con lo obtenido en los frutos inmaduros de este estudio, pues fueron las naranjillas en estado pintón las menos afectadas. Por otro lado, *Colletotrichum* también se caracteriza por tener la capacidad de causar infecciones latentes o inactivas y vivir dentro de los tejidos sanos sin mostrar síntomas; sin embargo se desarrollan durante la fase de maduración cuando existen cambios en la superficie del fruto (Dávila et al., 2018). Por tal motivo, los resultados obtenidos en los frutos maduros de naranjilla se relacionan con la preparación incorrecta

de la solución de esporas, pues la cantidad del inóculo de 1×10^5 conidias/mL no fue suficiente para causar la infección.

Capítulo VI: Conclusiones

A partir de la toma de muestras en 3 provincias del Ecuador se obtuvo un total de 5 aislamientos del agente causal asociado a los síntomas de la antracnosis en naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

Existe variabilidad fenotípica con respecto a la coloración de las colonias de los cinco aislados, pues se observaron coloraciones de gris oscuro con tonalidad verdosa para los aislados T1-Pi y T2-Pi, en contraste con las coloraciones gris oscuro con tonalidad anaranjada para los aislados NM-SD, RV-Tu y RN-Tu. A pesar de que ninguno de los aislados llegó a identificarse con una especie de *Colletotrichum*, sus características fenotípicas o macroscópicas son propias del complejo de especies de *C. acutatum*.

Los conidios de los aislados de Pichincha y Tungurahua mostraron formas cilíndricas con ambos extremos agudos y un solo extremo agudo. Mientras que los conidios de NM-SD son fusiformes con ambos extremos agudos. Estos resultados coinciden con la morfología de las especies del complejo de *C. acutatum*.

La relación entre las medias del largo y ancho de los conidios permitió establecer la similitud de T1-Pi con T2-Pi (aislados de Pichincha) y RV-Tu con RN-Tu (aislados de Tungurahua). Sin embargo, los rangos de largo y ancho de los conidios no se asociaron con ninguna especie de *Colletotrichum* descrita, pero si fueron necesarios para complementar los estudios de caracterización en función de la región de donde se obtuvieron los aislados.

La secuenciación, el alineamiento y el análisis filogenético de los genes ITS y ACT permitieron demostrar que el agente causal de los síntomas de la antracnosis en naranjilla forma parte del complejo de especies de *Colletotrichum acutatum*. Sin embargo, la especie no pudo ser identificada con los marcadores utilizados en este estudio.

Tras la inoculación de frutos sanos de *Solanum quitoense* Lam. con aislados de *Colletotrichum* sp. del complejo *C. acutatum*, se confirmó que este hongo es el agente causal de los síntomas de la antracnosis en frutos de naranjilla.

Los resultados de este estudio de caracterización morfológica y molecular son un importante aporte para el conocimiento sobre el hongo causante de la antracnosis en frutos de naranjilla en Ecuador; esto a la vez podrá ser utilizado para tomar medidas preventivas, amigables con el ambiente, enfocadas en la erradicación del microorganismo en el país.

Capítulo VII: Recomendaciones

Las muestras obtenidas para este estudio se basan en la variedad común de *Solanum quitoense* Lam. y al híbrido Puyo, por lo que se recomienda obtener muestras del resto de variedades de cultivares de naranjilla para analizar diferencias o similitudes con respecto a las características macro y microscópicas del patógeno.

Este estudio no contiene el proceso de germinación de conidios de ninguno de los aislados, por lo que se recomienda que en futuras investigaciones se tome en cuenta la morfometría y caracterización de apresorios, debido a que son estructuras muy conservadas dentro de cada especie de *Colletotrichum*.

Debido a que los genes utilizados en la caracterización molecular no resultaron lo suficientemente eficientes para identificar la especie de *Colletotrichum*, se recomienda examinar otras regiones como: TUB2, GAPDH, CHS-1, HIS3 y CAL, con el fin de complementar el análisis molecular multilocus y esclarecer si el agente causal de la antracnosis en naranjilla es específico de este frutal.

Dentro de los estudios de identificación y caracterización de patógenos fúngicos es importante evaluar la capacidad de un patógeno para causar daño al huésped (patogenicidad). En este estudio se logró verificar la agresividad de los aislados frente a los frutos de naranjilla en función del tamaño de los síntomas, sin embargo estos resultados deberían ser respaldados por pruebas de sensibilidad a fungicidas. Además de ello, se podrían realizar estudios complementarios de patogenicidad de estos aislados en otros frutales, como en *Solanum betaceum*.

Capítulo VIII: Referencias

- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M. y Freeman, S. (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, 93(5), 579–587. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.5.579>
- Arrieta, M., Higuera, B. y Martínez, S. (2010). Inducción de fenilalanina amonio liasa y variación en el contenido de compuestos fenólicos en frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) infectados con *Colletotrichum acutatum*. *Acta Biológica Colombiana*, 15(1), 129-144.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2010000100009
- Bailey, J., O'Connell, R., Pring, R. y Nash, C. (1992). *Infection strategies of Colletotrichum species. Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB International.
- Barrendero, E., Perona, E. y Mateo, P. (2008). Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 447-460. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65273-0>
- Bhunjun, C., Phillips, A., Jayawardena, R., Promputtha, I. y Hyde, K. (2021). Importance of Molecular Data to Identify Fungal Plant Pathogens and Guidelines for Pathogenicity Testing Based on Koch's Postulates. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1096. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091096>
- Bragança, C., Damm, U., Baroncelli, R., Massola, N. y Crous, P. (2016). Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. *Fungal Biology*, 120(4), 547–561.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.011>

- CABI. (2021). *Colletotrichum*. In: Invasive Species Compendium. CAB International.
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/14888>
- Caicedo, J., Lalangui, K., Pozo, A., Cevallos, P., Arahana, V. y Méndez, K. (2017).
Multilocus molecular identification and phylogenetic analysis of *Colletotrichum tamarilloi* as the causal agent of Tamarillo (*Solanum betaceum*) anthracnose in the Ecuadorian highlands. *Eur J Plant Pathol*, 148(4), 983–996.
<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1155-3>
- Caicedo, O. y Higuera, B. (2007). Inducción de polifenoxidasas en frutos de lulo (*Solanum quitoense*) como respuesta a la infección con *Colletotrichum acutatum*. *Acta Biológica Colombiana*, 12(1), 41-54.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2007000300004
- Carbone, I. y Kohn, L. (1999). A method for designing sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *The Mycological society of America*, 91(3), 553 – 556.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Castro, P., Bravo, C., Cabrera, A., Quillay, N., Ramón, M., Belesaca, I. y Diaz, L. (2019). Caracterización morfológica y molecular del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol en Azuay y Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 1–15.
<https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/579>
- Climate-data (s.f.). *Clima: Provincia de Tungurahua*. CLIMATE-DATA.ORG
<https://es.climate-data.org/america-del-sur/ecuador/provincia-de-tungurahua-53/>
- Crouch, J., Clarke, B. y Hillman, B. (2009). What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored gramminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia*, 101(5), 648–656.
<https://doi.org/10.3852/08-231>

- Da Silva, L., Moreno, H., Correia, H., Santana, M. y de Queiroz, M. (2020). *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1891-1904.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10363-y>
- Damm, U., Cannon, P., Woudenberg, J. y Crous, P. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73(1), 37–113.
<https://doi.org/10.3114/sim0010>
- Dávila, M., Chaves, W. y Yáñez, J. (2018). Fungal communities isolated from symptomatic naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) leaves in the Ecuadorian Amazon region. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 39(1), 39-49. <https://doi.org/10.26807/remcb.v39i1.561>
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M. y Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), W465–W469.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Falconí, C., Visser, R. y Heusden, A. (2013). Phenotypic, Molecular, and Pathological Characterization of *Colletotrichum acutatum* Associated with Andean Lupine and Tamarillo in the Ecuadorian Andes. *Plant Dis*, 97(6), 819 – 827.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0175-RE>
- Federhen S. (2015). Type material in the NCBI Taxonomy Database. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D1086–D1098.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku1127>
- Fuentes, C. (2007). Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 1(2), 262-266.
<http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/view/RCCV0707230262A>

- Gancel, A., Alter, P., Dhuique-Mayer, C., Ruales, J. y Vaillant, F. (2008). Identifying 351 carotenoids and phenolic compounds in naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. var. Puyo 352 hybrid), an Andean fruit. *J Agric Food Chem*, 56(24), 11890-11899. <https://doi.org/10.1021/jf801515p>
- Gañán, L., Álvarez, E. y Castaño, J. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Rev. Acad. Colombiana*, 39 (152) 9, 339-347. <http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.192>
- Gómez, F., Trejo, L., García, J. y Cadena, J. (2014). Lulo (*Solanum quitoense* [Lamarck.]) como cultivo novedoso en el paisaje agroecosistémico mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(9), 1741-1753. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i9.1061>
- Green, K., Mollov, D., Tran, L., Alvarez-Quinto, R., Ochoa, J., Quito-Avila, D. y Karasev, A. (2018). Characterization of a New Tymovirus Causing Stunting and Chlorotic Mosaic in Naranjilla (*Solanum quitoense*). *Plant disease*, 102(5), 911-918. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1534-RE>
- Guamán, M. (2018). *Caracterización morfológica, molecular y de resistencia a fungicidas de Colletotrichum sp., aislado de tomate de árbol (Solanum betaceum)*. [Tesis de Pregrado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15066>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (2014). *Naranjilla*. INIAP: <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rnaranjilla>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2019). *Fortalecimiento de la investigación para mejorar la productividad y calidad de la naranjilla y tomate de árbol, en el Ecuador*. INIAP: http://www.iniap.gob.ec/pruebav3/wp-content/uploads/2020/08/Proyecto%20Solanaceas_AECID.pdf

- Jarrín, J. (2009). Síntomas y control químico de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en naranjilla (*Solanum quitoense*). [Tesis de Pregrado, Escuela Politécnica del Ejército].
- Jayawardena, R., Hyde, K., Damm, U., Cai, L., Liu, M., Li, X., Zhang, W., Zhao, W. y Yan, J. (2016) Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere* 7(8) 1192–1260. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/2c/9>
- Lalangui, K. (2015). *Caracterización morfológica y molecular de Colletotrichum spp., en tomate de árbol (Solanum betaceum) en la sierra ecuatoriana*. [Tesis de Pregrado, Universidad Central del Ecuador].
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/7074>
- Montes, C., Muñoz, L., Terán, V., Prado, F. y Quiñónez, M. (2010). Evaluación de patógenos en clones de lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *Acta Agronómica*, 59(2), 144-154.
https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/16273
- Nieto, D., Almaraz, A., Ayala, V., Orozco, M. y Lara, F. (2019). Primer reporte de *Colletotrichum coccodes* en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en México. *Rev. Fitotec. Mex.*, 42(3), 195-200.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v42n3/0187-7380-rfm-42-03-00195.pdf>
- Ochoa L., J., Ellis, M. y Alwang, J. (2010). *Ojo de pollo de la naranjilla y su control*. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento Nacional de Protección Vegetal.
- Oliveira, R., Moral, J., Bouhmidi, A. y Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 31(4), 531-548.
<http://hdl.handle.net/10396/2420>

- Ponce, J. (2013). Evaluación de la resistencia a roya amarilla (*Puccinia striiformis*) y roya de la hoja (*Puccinia triticina*) en el germoplasma promisorio de trigo (*Triticum aestivum* L.) del INIAP. [Perfil de proyecto de investigación: INIAP] <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1026/1/iniapscP.P792e2012.pdf>
- Prusky, D., Freeman, S. y Dickman, M. (2000). *Colletotrichum. Host specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*. The American Phytopathological Society.
- Revelo, J., Viteri, P, Vásquez, W., Valverde, W., Valverde F., León, H. y Gallegos., P (2010). *Manejo del cultivo ecológico de la naranjilla*. INIAP: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4907/1/iniapscmt77.pdf>
- Riera, N. (2015). *Caracterización molecular y de patogenicidad de Colletotrichum spp., en bananas var cavendish y pruebas de antagonismo con Trichoderma spp, recolectadas en fincas bananeras de la región costa del Ecuador*. [Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/4461>
- Rivers T. M. (1937). Viruses and Koch's Postulates. *Journal of bacteriology*, 33(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/jb.33.1.1-12.1937>
- Rojas, J. (2017). *Solanum quitoense (naranjilla)*. *Invasive Species Compendium*. CABI. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/50543>
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A. y Chen, W (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schoch, C. L., Robbertse, B., Robert, V., Vu, D., Cardinali, G., Irinyi, L., Meyer, W., Nilsson, R. H., Hughes, K., Miller, A. N., Kirk, P. M., Abarenkov, K., Aime, M. C., Ariyawansa, H. A., Bidartondo, M., Boekhout, T., Buyck, B., Cai, Q., Chen, J.,

- Crespo, A., ... Federhen, S. (2014). Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2014, bau061.
<https://doi.org/10.1093/database/bau061>
- Sistema de Información Pública Agropecuaria (2019). *Boletín situacional MAGAP. Naranjilla*. SIPA: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/frutas/naranjilla>
- Sreenivasaprasad, S., Mills, P., Meehan, B. y Brown, A. (1996). Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*, 39(3), 499–512. <https://doi.org/10.1139/g96-064>
- Stamatakis A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Than, P., Shivas, R., Jeewon, R., Pongsupasamit, S., Marney, T., Taylor, P. y Hyde, K. (2008). Epitypification and phylogeny of *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds. *Fungal Diversity*, 28, 97–108.
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.653.4300&rep=rep1&type=pdf>
- Vaidya, G., Lohman, D. y Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2), 171-180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>

- Vásquez, W., Viteri, P., Martínez, A. y Villares, M. (2011). *NARANJILLA (Solanum quintoense Lam.): Tecnología para mejorar la productividad y la calidad de la fruta*. [Folleto. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias].
- Volci, C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115.
<http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n1/v26n1a13.pdf>
- Wharton, S. y Diéguez, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 62(1), 3-22.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55661101>
- Weir, B. S., Johnston, P. R. y Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73(1), 115–180.
<https://doi.org/10.3114/sim0011>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.
<https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Nenad, T., Dolovac, N., Aleksić, G. y Balaž, J. (2010). Morphological and Molecular Identification of *Colletotrichum acutatum* from Tomato Fruit. *Pesticidi i Fitomedicina*, 25(3), 231-239.
<https://doi.org/10.2298/PIF1003231Z>

Anexos