



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE

TRABAJO DE UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

“Identificación de especies del género *Colletotrichum* en distintos hospederos, mediante indicadores morfométricos, metabólicos y moleculares”

Autor: Jácome Garrido Nadin Sabina

Director: Ing. Francisco Flores PhD



Contenido

1. Introducción

2. Objetivos e hipótesis

3. Marco teórico

4. Materiales y métodos

5. Resultados y Discusión

6. Conclusiones y recomendaciones



1. Introducción


Formulación del problema

Anualmente se pierde el 40% de cultivos por presencia de plagas y enfermedades. 23% por infecciones fúngicas.

En Ecuador, las pérdidas ascienden a más de 200 mil dólares. Se han reportado 64 géneros de hongos fitopatógenos

4 especies son del género *Colletotrichum* y son causantes de la enfermedad antracnosis en cultivos fuitales, ornamentales, hortalizas, cereales, etc.

Justificación



Exporta más de 6 mil millones de dólares en productos vegetales.

Importa más de mil millones de dólares en productos vegetales

Susceptibles a infecciones micóticas del género *Colletotrichum*

Evitar ingreso de plagas nuevas y control o erradicación de las presentes



2. Objetivos

Objetivo general

- Identificar especies del género *Colletotrichum* en distintos hospederos, mediante indicadores morfométricos, metabólicos y moleculares.

Objetivos específicos

- Aislar hongos del género *Colletotrichum* presentes en distintos hospederos.
- Determinar morfométrica y metabólicamente las especies de los aislados obtenidos.
- Identificar molecularmente a los aislados mediante el análisis de un fragmento del gen de elongación 1 alfa y de la región transcrita interna.



2. Hipótesis

Los ensayos morfométricos, metabólicos y moleculares, son selectivos y específicos para la identificación de especies de *Colletotrichum*.



3. Marco teórico

Colletotrichum es un género de hongos fitopatógenos, perteneciente a la familia *Glomerellaceae*.



Es el causante de los síntomas de antracnosis en cultivos de importancia económica y ornamentales.



Está conformado por más de 250 especies y debido a su complejidad genética se ha clasificado en complejos de especies.



- *Acutatum*
- *Agaves*
- *Boninense*
- *Caudatum*
- *Dematium*
- *Destructivum*
- *Dracaenophilum*
- *Gigasporum*
- *Gloeosporioides*
- *Graminicola*
- *Magnum*
- *Orbiculare*
- *Orchidearum*
- *Spaethianum*
- *Truncatum*



3. Marco teórico

Colonias circulares, con micelio aéreo, de color gris, blanco, marrón, salmón, verde, rosa o violeta dependiendo de la especie.

Conidios circulares, hialinos, cilíndricos con extremos redondeados, fusiformes o ambos

Ciclo de vida endófito, hemibiotrófico, necrotófico, latente o quiescente



C. tropicale

C. gloeosporioides

C. kahawae

C. theobromicola



Extremos fusiformes

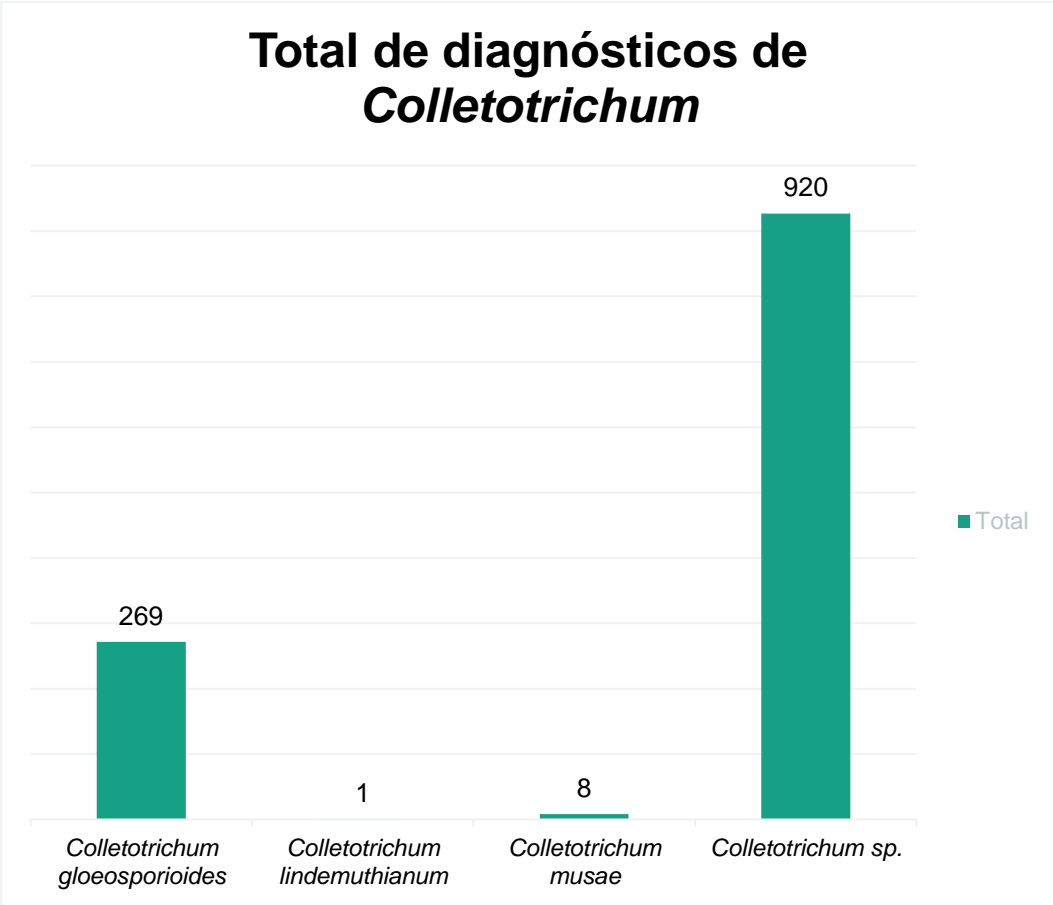
Extremos redondeados

Fusiformes y redondeados

3. Marco teórico

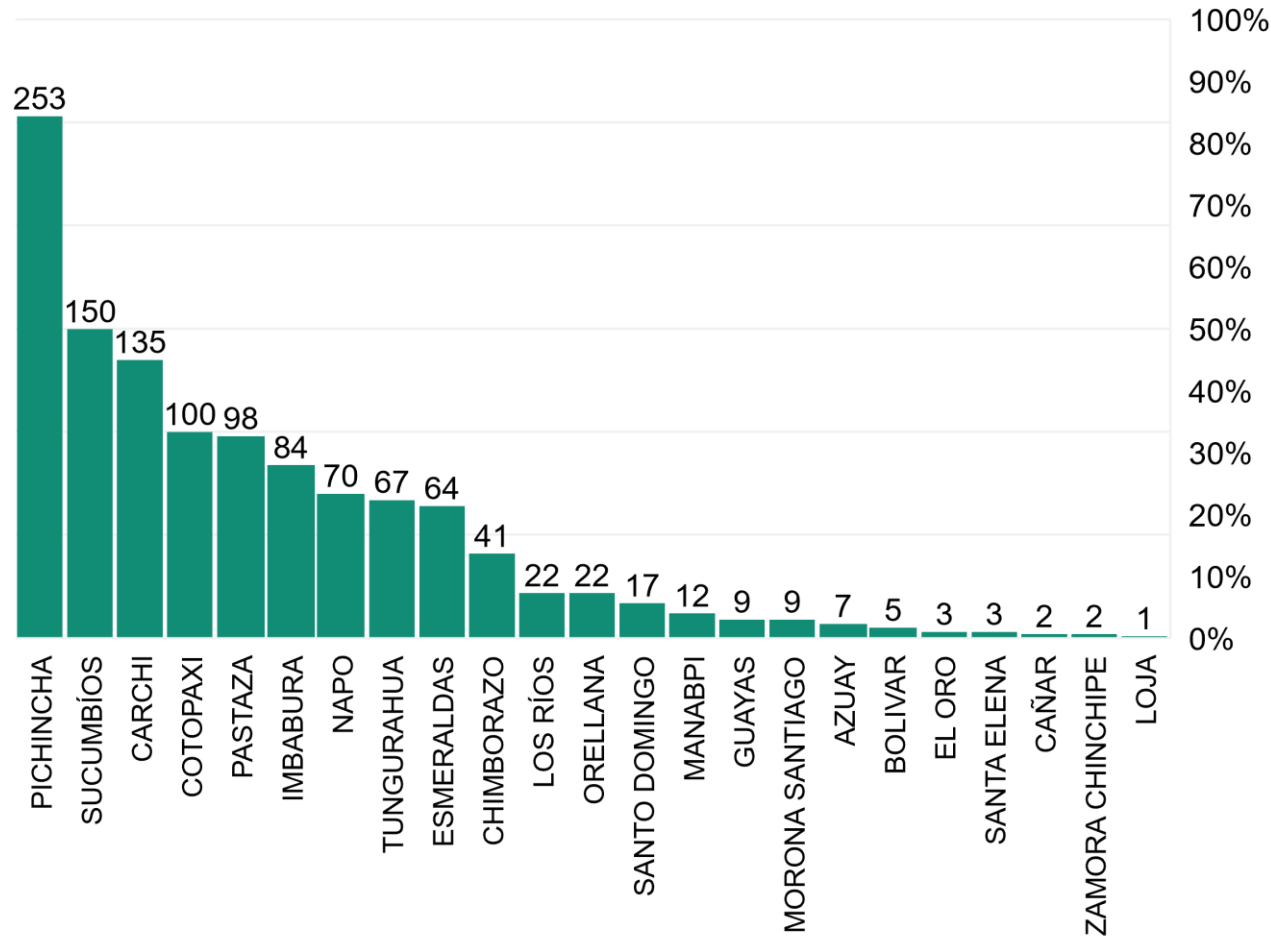
Plagas cuarentenarias no presentes en Ecuador	Plagas diagnosticadas en el laboratorio de Fitopatología
<i>Colletotrichum circinans</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
<i>Colletotrichum coffeanum</i>	<i>Colletotrichum musae</i>
<i>Colletotrichum dematium</i>	
<i>Colletotrichum destructivum</i>	
<i>Colletotrichum fragariae</i>	
<i>Colletotrichum godetiae</i>	
<i>Colletotrichum graminícola</i>	
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	
<i>Colletotrichum lagenaria</i>	
<i>Colletotrichum lili</i>	
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	
<i>Colletotrichum siamense</i>	
<i>Colletotrichum spinaciae</i>	
<i>Colletotrichum sublineolum</i>	
<i>Colletotrichum truncatum</i>	

Del 2013 al 2021, el laboratorio de Fitopatología diagnosticó *Colletotrichum* en 1198 ocasiones.

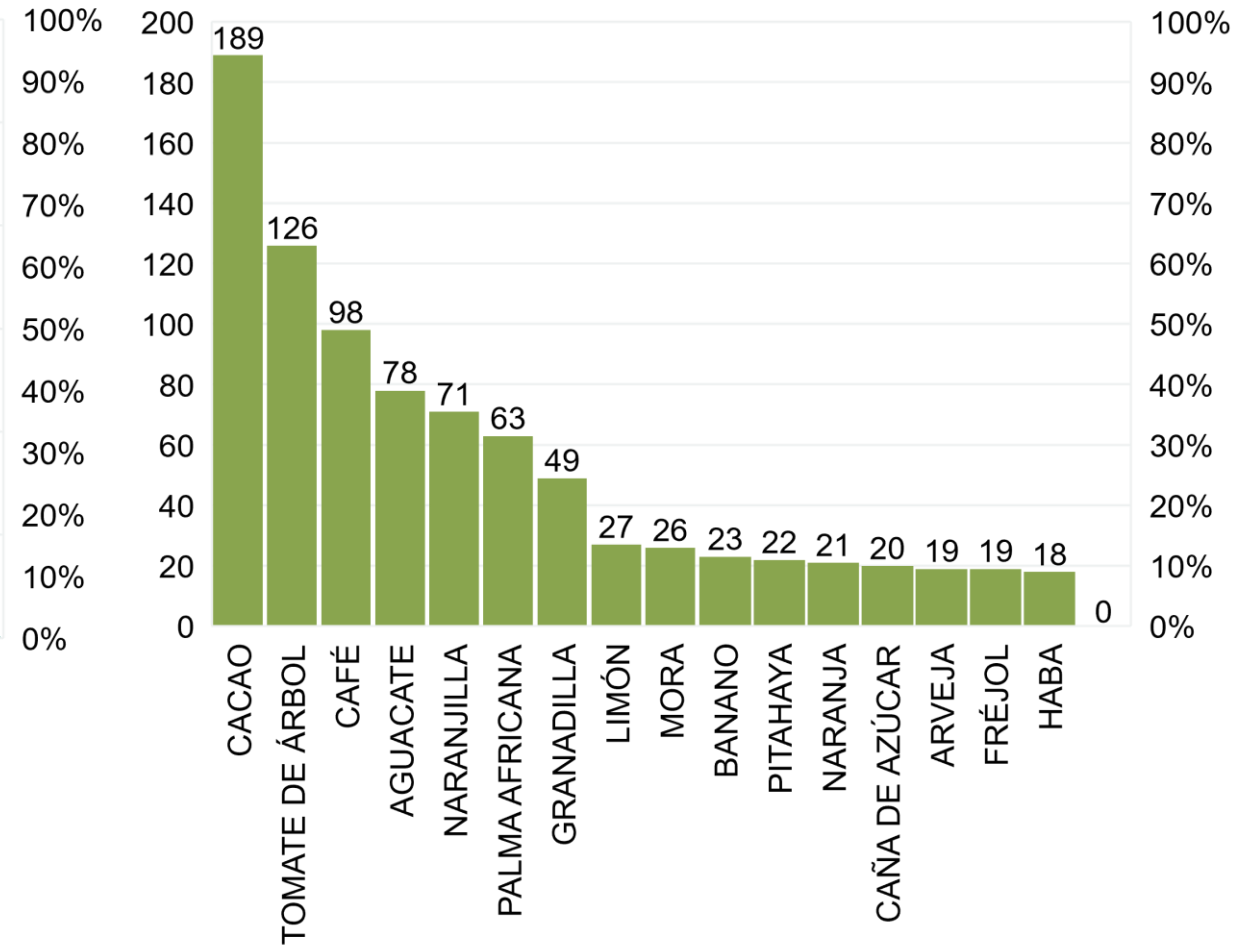


3. Marco teórico

Diagnósticos de *Colletotrichum* por provincia



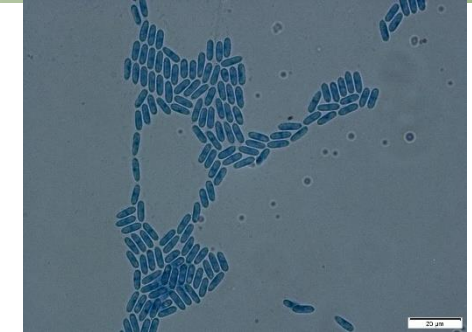
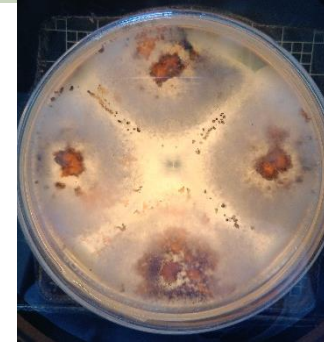
Diagnósticos de *Colletotrichum* por cultivo



3. Marco teórico

Identificación Morfométrica

- Observación macroscópica
- Observación microscópica



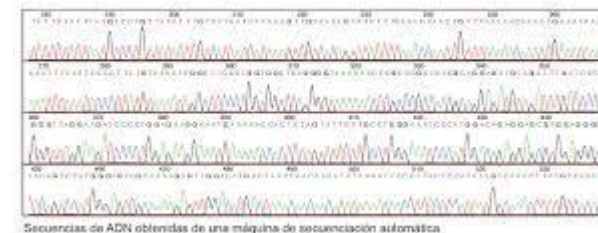
Identificación Metabólica

- Pruebas bioquímicas
- Análisis BIOLOG



Identificación Molecular

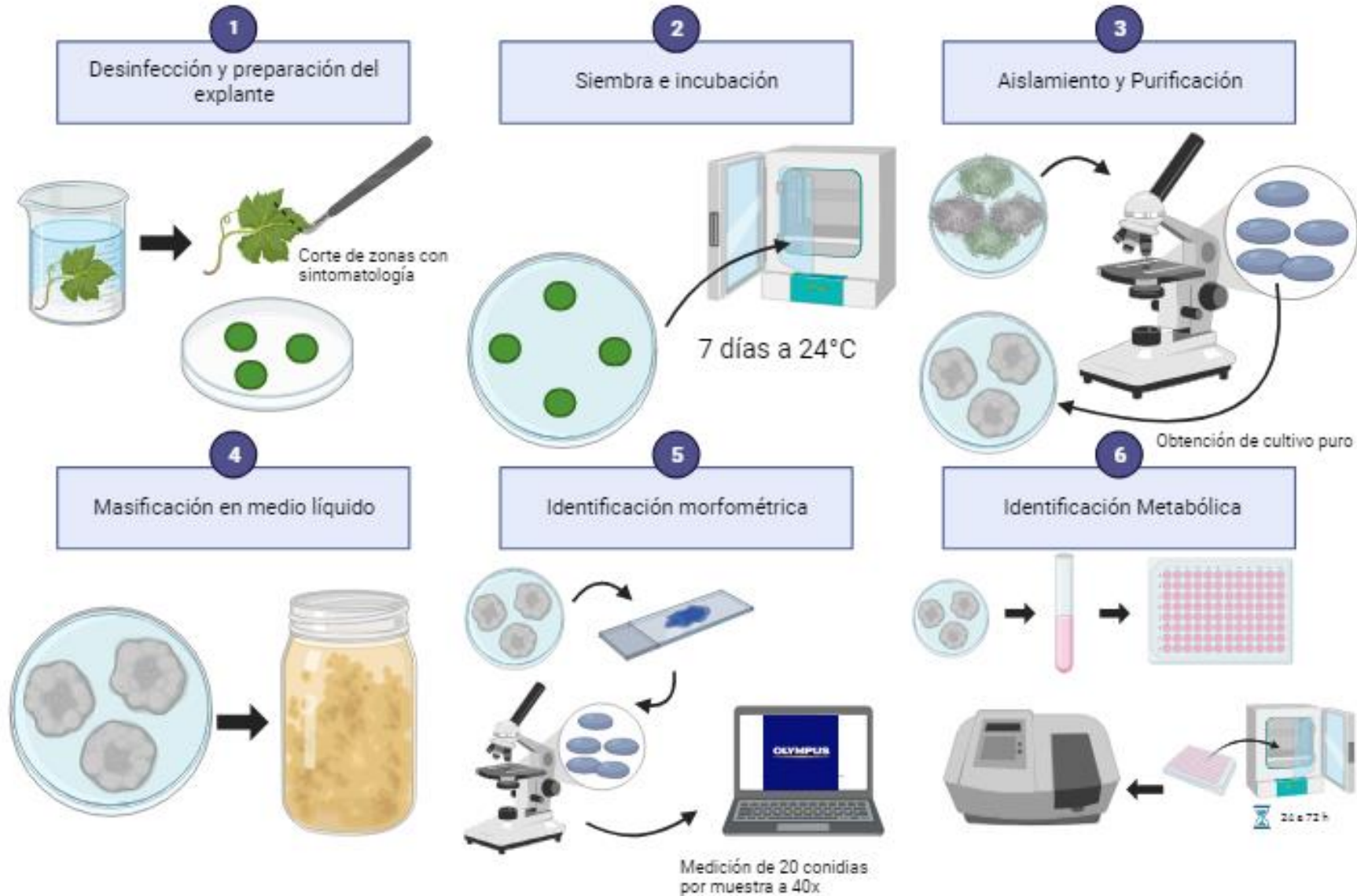
- PCR con primers específicos
- PCR con primers universales
- Secuenciación



Secuencias de ADN obtenidas de una máquina de secuenciación automática



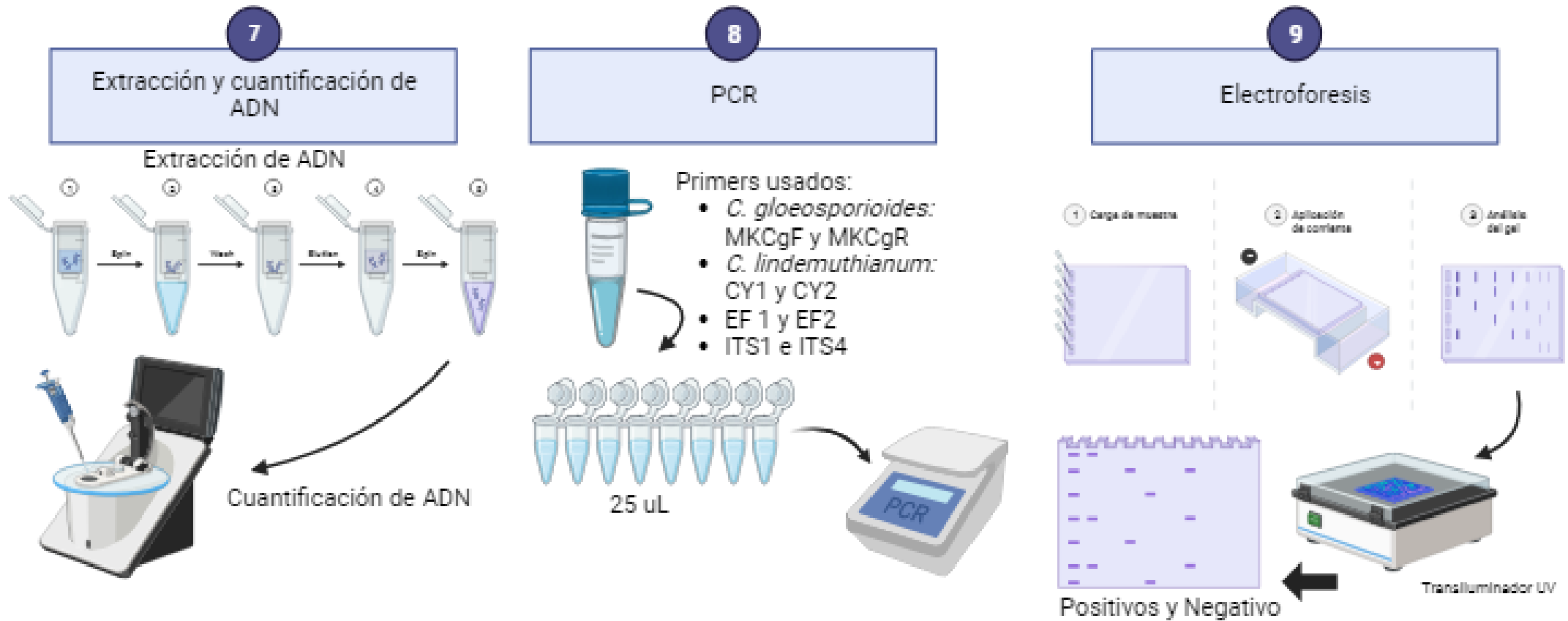
4. Materiales y métodos



- Se siguió el protocolo de desinfección, siembra y aislamiento de Castellanos et al. (2011).
- Para la identificación morfológica se usó el software cellSens Standard 1.16 de OLYMPUS CORPORATION.
- La lectura de la microplaca se realizó en el lector Biolog Micro Station™ con el software MicroLog 3.

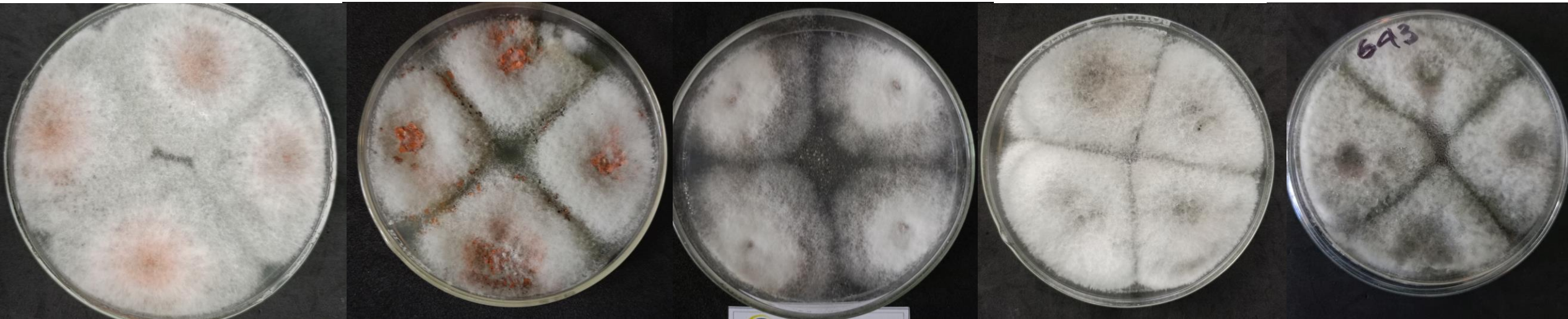


4. Materiales y métodos



5. Resultados y discusión

Análisis morfométrico



Limón

Cacao

Haba

Maní

Café



Todas las cepas obtenidas fueron de forma circular, crateriformes, algodonosas, de micelio aéreo y márgenes filiformes tal como describe Oliveira et al. (2005). al género *Colletotrichum*.

Se observó diferencias morfológicas macroscópicas entre cepas provenientes del mismo tipo de cultivo y también entre cultivos.

5. Resultados y discusión

Análisis morfométrico

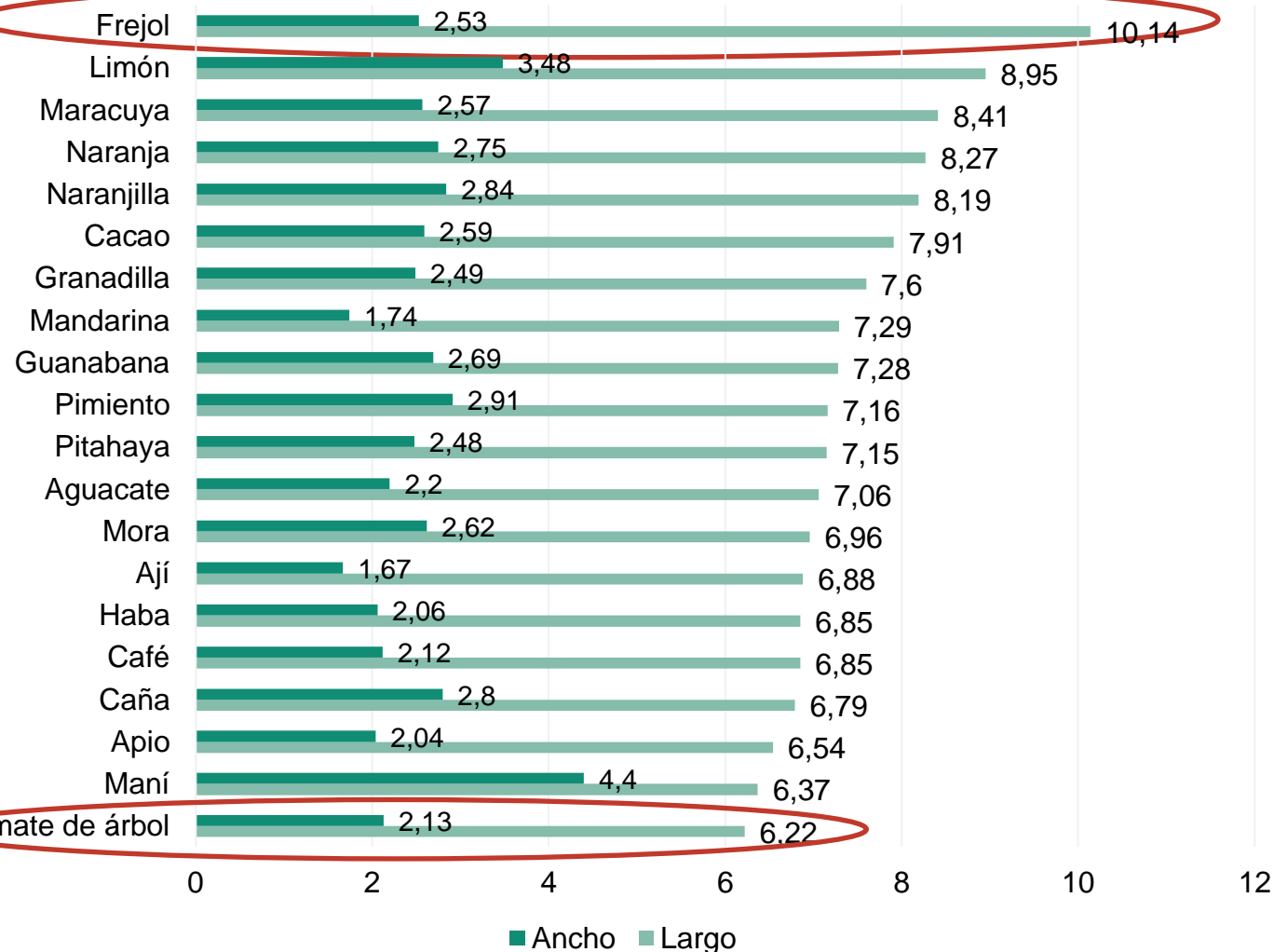
Hospedero	Color colonia	Color reverso
Aguacate	Blanco	Salmón
Ají	Blanco	Salmón
Apio	Blanco	Blanco
Cacao	Gris claro	Gris claro
Café	Blanco	Salmón
Caña	Blanco	Salmón
Frejol	Blanco	Salmón
Granadilla	Gris	Salmón
Guanabana	Gris claro	Salmón
Haba	Blanco	Salmón
Limón	Gris oscuro	Gris oscuro

Hospedero	Color colonia	Color reverso
Mandarina	Gris claro	Salmón
Maní	Blanco	Salmón
Maracuyá	Blanco	Blanco
Mora	Blanco	Blanco
Naranja	Blanco	Salmón
Naranjilla	Blanco	Salmón
Pimiento	Blanco	Blanco
Tomate de árbol	Gris claro	Gris claro
Pitahaya	Blanco	Salmón



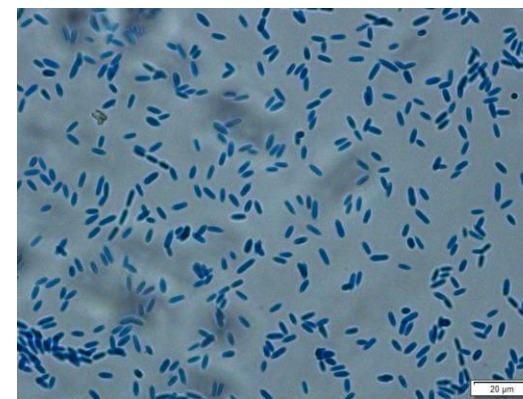
5. Resultados y discusión

Promedio de largo y ancho de conidias por hospedero



Se diagnosticó *Colletotrichum* en 20 hospederos.

Los conidios que presentaron un tamaño mayor a 7μm de largo y 2 μm de ancho fueron identificados como *C. gloeosporioides* (Perez et al., 2011).



Conidios de tomate de árbol



Conidios de frejol



5. Resultados y discusión

Análisis metabólico

Se seleccionaron 6 aislados puros para la identificación metabólica.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	●	○	●	○	◐	●	●	●	●	●	●
B	○	○	●	◐	●	○	◐	●	●	◐	○	●
C	○	○	○	●	●	●	○	●	◐	●	●	●
D	●	●	●	●	○	●	○	●	●	○	●	●
E	●	●	○	●	○	●	●	○	●	●	●	●
F	●	●	●	○	○	●	●	●	●	●	●	●
G	●	○	●	●	●	○	◐	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	100	0	100	0	50	100	100	100	100	100	100
B	0	0	100	50	100	0	50	100	100	50	0	100
C	0	0	0	100	100	100	0	100	50	100	100	100
D	100	100	100	100	0	100	0	100	100	0	100	100
E	100	100	0	100	0	100	100	0	100	100	100	100
F	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100
G	100	0	100	100	100	0	50	100	100	100	100	100
H	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0

Patrón metabólico de color de *C. gloeosporioides*

Patrón metabólico de turbidez de *C. gloeosporioides*



5. Resultados y discusión

Análisis metabólico

El software identificó tres de los cinco aislados como *Colletotrichum gloeosporioides* con probabilidad de confianza entre 0,997 y 1,00

Número de muestra	Cultivo	Resultado
FP-23-0287	Haba	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
FP-23-0362	Cacao	No identificado
FP-23-0415	Maní	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
FP-23-0643	Café	No identificado
FP-23-0651	Tomate de árbol	No identificado
FP-23-0769	Limón	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>



5. Resultados y discusión

Análisis molecular

Se analizaron las 45 muestras obtenidas con primers específicos MKCgF y MKCgR; CY1 y CY2

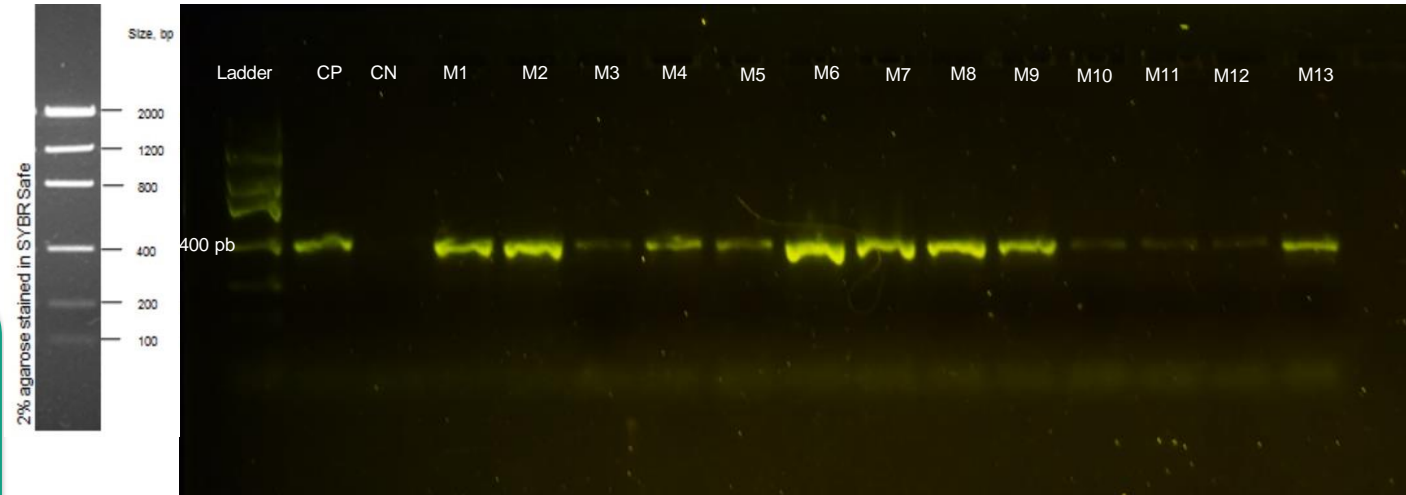


Todas las muestras dieron negativo para *C. lindemuthianum*.

Según Martínez et al. (2014), el par de primers CY1 y CY2 son específicos para la detección de *C. lindemuthianum* y deben generar amplicones únicos de 442 pb

33 muestras positivas para *C. gloeosporioides*.

Según Kamle et al. (2013), el par de primers MKCgF y MKCgR producen un amplicón con un tamaño de 380 pb y son específicos para la detección de *C. gloeosporioides*.

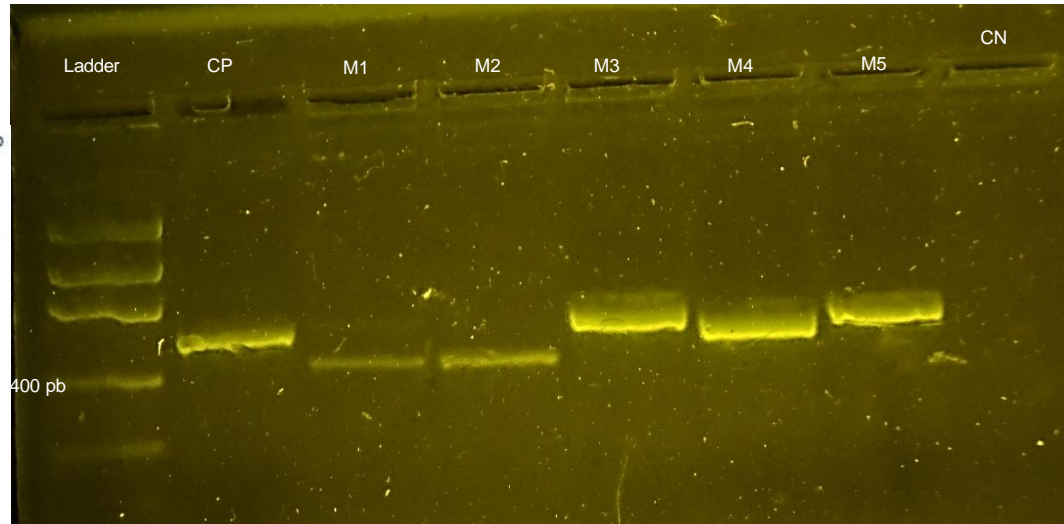


Amplificación de fragmentos de *C. gloeosporioides*



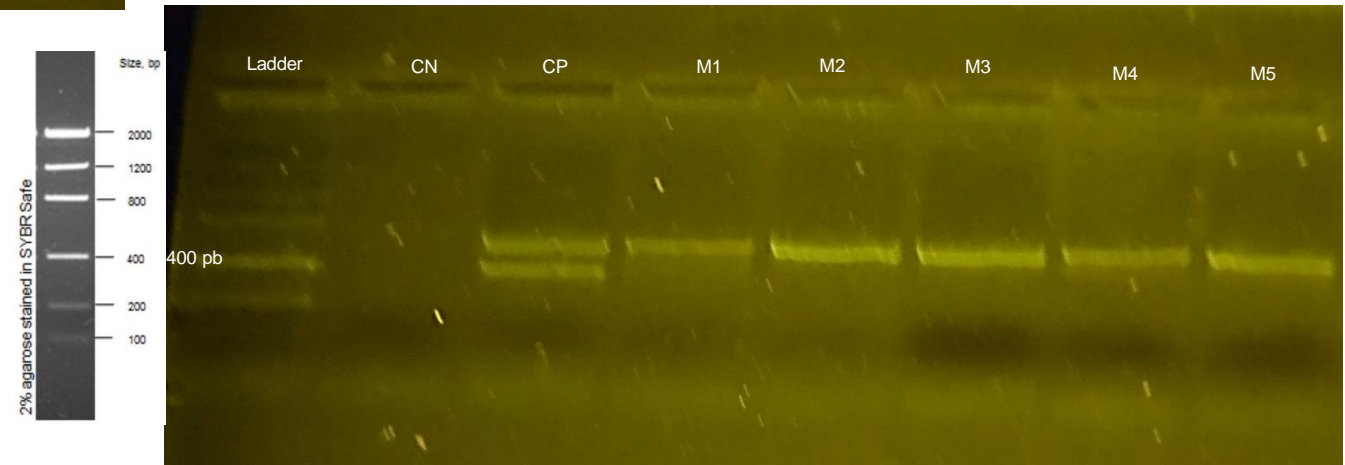
5. Pruebas y resultados

Análisis molecular



Los cebadores EF1 y EF2
amplifican fragmentos de 520
pb para *C. gloeosporioides*

Los cebadores universales
ITS1 e ITS4 amplifican
fragmentos de 570 pb para *C.
gloeosporioides*



6. Conclusiones

Los métodos morfométricos no son selectivos ni específicos para la identificación de especies de *Colletotrichum*. Sin embargo, los métodos metabólicos y moleculares si son específicos y selectivos para la identificación de especies de *Colletotrichum*

Los hongos del género *Colletotrichum* son agentes causantes de la antracnosis en cultivares de aguacate, ají, apio, cacao, café, caña, frejol, granadilla, guanábana, haba, limón, mandarina, maní, maracuyá, mora, naranja, naranjilla, pimiento, pitahaya y tomate de árbol.

El complejo de especies *C. gloeosporioides* presenta colonias con forma circular, crateriformes, algodonosas, márgenes filiformes y micelio aéreo de colores blanco, gris claro, gris oscuro o salmón, según el tipo de cultivo del que se aísle el patógeno.



6. Conclusiones y recomendaciones

La especie *C. gloeosporioides* presenta conidios de forma cilíndrica, de aspecto redondo de un lado, ahusado por el otro o con ambos extremos redondos. El largo de sus conidias varía desde 6,22 μm a 10,14 μm y su ancho varía de 1,67 μm a 3,29 μm según el cultivo desde el que ha sido aislado el patógeno. No obstante, la descripción de la morfología de los conidios y su tamaño no son característica suficiente para distinguir entre especies de *Colletotrichum*.

La especie *C. gloeosporioides* puede ser identificada por el sistema de identificación microbiana BIOLOG al tercer día de incubación, sin embargo, para que esto suceda, el aislado debe ser reciente, estar puro y deben seguirse las instrucciones del fabricante para la preparación de la microplaca.

La especie *C. gloeosporioides* puede ser identificada con el uso de los primers específicos MKCgF y MKCgR generando amplicones de 380 pb.

La especie *C. gloeosporioides* amplifica fragmentos EF a una altura de 520 pb y fragmentos ITS a una altura de 570 pb.



6. Conclusiones y recomendaciones

Evitar medir conidios inmaduros cuando se realiza el análisis morfométrico de *Colletotrichum*.

Comprobar la patogenicidad y ciclo de vida de los aislados de *Colletotrichum* mediante postulados de Koch.

Probar si el resultado de identificación mediante BIOLOG se ve influenciado por cambios en el protocolo de preparación de fluido de inóculo.

Realizar extracción de ADN de aislados puros y masificados en medio líquido para obtener ADN de buena calidad y alto peso molecular.

Es necesario secuenciar las cepas cuyo resultado fue negativo ante los primers MKCgF y MKCgR.

Corroborar que los fragmentos EF no generen palíndromos después de la PCR.



Agradecimientos



AGROCALIDAD

AGENCIA DE REGULACIÓN Y
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA