



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

Jacome Garrido, Nadin Sabina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

Sangolquí, 30 de abril del 2023

Copyleaks

Plagiarism report

Tesis Nadin Jacome.txt

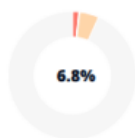
Scan details

Scan time:
August 26th, 2023 at 1:32 UTC

Total Pages:
36

Total Words:
8808

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
● Identical	1.7%	146
● Minor Changes	0.2%	16
● Paraphrased	5%	436
● Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
● AI text
● Human text



FRANCISCO JAVIER
FLORES FLOR

Flores Flor, Francisco Javier

Tutor del proyecto



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **"Identificación de especies del género *Colletotrichum* en distintos hospederos, mediante indicadores morfométricos, metabólicos y moleculares"** fue realizado por la señorita **Jacome Garrido Nadin Sabina**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 26 de agosto del 2023



FRANCISCO JAVIER
FLORES FLOR

.....
Flores Flor, Francisco Javier

C. C. 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Jácome Garrido Nadin Sabina**, con cédula/cédulas de ciudadanía n°1751935519, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Identificación de especies del género *Colletotrichum* en distintos hospederos, mediante indicadores morfométricos, metabólicos y moleculares"** 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, 26 de agosto del 2023

Jácome Garrido Nadin Sabina

C.C.: 1751935519



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Jácome Garrido Nadin Sabina**, con cédula de ciudadanía n°1751935519, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "**Identificación de especies del género *Colletotrichum* en distintos hospederos, mediante indicadores morfométricos, metabólicos y moleculares**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 26 de agosto del 2023

Jácome Garrido Nadin Sabina

C.C.:1751935519

Dedicatoria

A mi hermana, por acompañarme

A mi padre, por alentarme

A mis abuelos, por cuidarme

A mi tía, por apoyarme

A mi mejor amigo, por nunca dejarme

Y a mi pequeño Nepomuceno, por todo.

Agradecimientos

Agradezco a la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario – AGROCALIDAD por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones y darme la oportunidad de mejorar mis conocimientos día con día, al Ing. Jairo Guevara, por su conocimiento, paciencia, tiempo y dedicación que me brindó durante la realización de este trabajo, al Ing. Hernando Regalado y Patricia Garrido, por permitirme realizar esta investigación en el Laboratorio de Fitopatología y recordarme siempre la importancia de este trabajo.

Agradezco al departamento de Biotecnología y a todos sus docentes por darme los conocimientos necesarios durante la carrera para que este trabajo sea realizado de la mejor manera posible, especialmente al PhD Francisco Javier Flores Flor, por ser mi tutor de tesis, brindarme sus consejos y sugerencias durante la investigación.

A mi familia, Alexis, Fernanda, Galo, Celia y Anahí, por acompañarme durante toda esta trayectoria, estar presentes en los buenos y malos momentos, y, sobre todo, animarme a continuar día a día pese a las adversidades.

A mi mejor amigo, Christian, porque su sola presencia ilumina mis días más grises y me recuerda que la vida es muy corta como para dejarla pasar.

A mis amigos, Uwe, Lis, Jose, Angie, Karo, Blanqui, Pao, Marco y Fer, por ser la distracción y el apoyo que muchas veces necesitaba.

A mi compañera de tesis, Jessi, por toda su ayuda durante este trabajo y por su amistad después de él.

A mi pequeño conejo, Nepomuceno, que, a pesar de ya no estar aquí, fue la inspiración para llegar hasta este momento, gracias por todo.

Índice de contenidos

Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas	11
Índice de figuras.....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Formulación del problema	16
Justificación del problema.....	16
Objetivo del proyecto	18
Objetivo General.....	18
Objetivo específico	18
Hipótesis.....	18
Capítulo II: Marco Teórico.....	19
Generalidades del Género <i>Colletotrichum</i>	19
Morfología.....	19
Clasificación.....	20
Plantas hospederas.....	23
Ciclo de crecimiento	26

Sintomatología.....	27
Biología y ecología	28
Especies cuarentenarias presentes en el Ecuador	29
Métodos de Identificación de <i>Colletotrichum</i>	30
Observación macroscópica	30
Observación microscópica.	30
Cultivo en medio.....	30
Pruebas bioquímicas.	30
Análisis molecular.....	30
Capítulo III: Materiales y Métodos	31
Instituciones participantes.....	31
Colaboradores científicos	31
Área de Estudio.....	31
Material Biológico	31
Aislamiento, purificación y masificación	35
Siembra de material vegetal y aislados preservados	35
Purificación de cultivos	36
Masificación de micelio.....	36
Identificación morfológica macroscópica y microscópica del hongo aislado.....	36
Identificación Metabólica.....	37
Preparación antes del ensayo.....	37

Preparación y siembra del inóculo	37
Lectura de la microplaca y resultados	38
Identificación molecular del hongo aislado.....	38
Extracción de ADN mediante kit comercial para su uso en la secuenciación.....	38
Cuantificación del ADN.....	39
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	39
Electroforesis.....	41
Capítulo IV: Resultados	42
Análisis morfométrico.....	42
Análisis metabólico	52
Análisis molecular	53
Capítulo V: Discusión.....	60
Capítulo VI: Conclusiones	64
Capítulo VII: Recomendaciones	65
Capítulo VIII: Bibliografía	66

Índice de tablas

Tabla 1 Las diez especies de Colletotrichum con el mayor número de hospederos ..	24
Tabla 2 Número de combinaciones de especies de Colletotrichum - huésped por complejo.....	24
Tabla 3 Número de especies hospedantes, de combinaciones hongo-huésped y número de especies y complejos de especies de <i>Colletotrichum</i> por familia hospedante	25
Tabla 4 Listado de especies cuarentenarias de Colletotrichum presentes y no presentes en Ecuador.....	29
Tabla 5 Muestras seleccionadas para el análisis de Colletotrichum , con su procedencia y cultivo afectado	32
Tabla 6 Cebadores evaluados para la amplificación de la región interna transcrita para la detección del género Colletotrichum	40
Tabla 7 Componentes de la Master Mix usados en las reacciones PCR para la amplificación de la región interna transcrita con los cebadores universales ITS 1 e ITS 4 y EF 1.	40
Tabla 8 Parámetros de amplificación por PCR usando ITS 1 e ITS 4	41
Tabla 9 Análisis morfológico macroscópico cualitativo de los aislados de Colletotrichum en las provincias donde fueron recolectadas las muestras.	43
Tabla 10 Morfología microscópica cualitativa de los conidios de cada aislado de Colletotrichum	45
Tabla 11 Promedio \pm Desviación estándar del largo de los conidios de los aislados.....	47
Tabla 12 Promedio \pm Desviación estándar del ancho de los conidios de los aislados...	49
Tabla 13 Resultados de lecturas BIOLOG.....	52
Tabla 14 Concentración de ADN extraído.....	53

Tabla 15 Resultados de la electroforesis tras la amplificación con los cebadores MKCgF y MKCgR.....	57
---	----

Índice de figuras

Figura 1 Síntomas de enfermedad causados por distintas especies de Colletotrichum	34
Figura 2 Comparación de morfología macroscópica de 2 cepas de Colletotrichum aislado de Cacao	45
Figura 3 Ejemplo de microplaca BIOLOG FF microplate.....	53
Figura 4 Electroforesis de la amplificación con los cebadores MKCgF y MKCgR.....	56
Figura 5 Electroforesis de la amplificación con los cebadores MKCgF y MKCgR.....	56
Figura 6 Electroforesis de la amplificación con los cebadores MKCgF y MKCgR.....	57
Figura 7 Electroforesis de amplificación de fragmentos con primers EF1 y EF2.....	59
Figura 8 Electroforesis de amplificación de fragmentos con primers ITS 1 e ITS 4	60

Resumen

Ecuador registra que anualmente se pierden más de doscientos setenta mil dólares por causa de enfermedades en cultivos. Uno de los hongos causantes de estas pérdidas es el género *Colletotrichum*, causante de la enfermedad de la antracnosis en cultivos de frutas, cereales, leguminosas, vegetales, ornamentales, etc. Se han reportado más de 240 especies de *Colletotrichum* alrededor del mundo que debido a su variabilidad genética han sido clasificados dentro de 15 complejos de especies. Para poder identificar especies del género *Colletotrichum* se aplicaron métodos morfométricos como la observación macroscópica y microscópica a los 7 días de inoculación del hongo en medio PDA, métodos metabólicos, comparando el patrón metabólico de un aislado en el sistema de identificación microbiana BIOLOG, y molecular, analizando los aislados mediante PCR con primers específicos MKCgF y MKCgR para detectar *C. gloeosporioides* y CY1 y CY2 para detectar *C. lindemuthianum*.y con primers universales EF1 y 2 e ITS 1 y 4. Se obtuvieron 45 cepas provenientes de 20 hospederos distintos con las cuales se realizaron los análisis. Se identificó morfológicamente la especie *C. gloeosporioides* en cultivos de aguacate, pitahaya, pimiento, guanabana, mandarina, granadilla, cacao, naranjilla, naranja, maracuyá, limón y frejol. La especie *C. gloeosporioides* se identificó en 6 aislados por el sistema de identificación microbiana BIOLOG y en 33 aislados con el uso de los primers específicos MKCgF y MKCgR generando amplicones de 380 pb, ninguno de los aislados fue identificado como *C. lindemuthianum*. Los primers universales EF 1 y 2 e ITS 1 y 4 generaron amplicones a alturas de 520 pb y 570 pb respectivamente, lo cual es correspondiente para hongos del género *Colletotrichum*.

Palabras clave: *Colletotrichum*, BIOLOG, morfometría, amplicones.

Abstract

In Ecuador, more than two hundred and seventy thousand dollars are lost annually due to crop diseases. One of the fungi causing these losses is the *Colletotrichum* genus, which causes the anthracnose disease in fruit crops, cereals, legumes, vegetables, ornamentals, etc. More than 240 species of *Colletotrichum* have been reported around the world, which due to their genetic variability have been classified within 15 species complexes. In order to identify species of the genus *Colletotrichum*, morphometric methods were applied such as macroscopic and microscopic observation after 7 days of inoculation of the fungus in PDA medium, metabolic methods, comparing the metabolic pattern of an isolate in the BIOLOG microbial identification system, and molecular, analyzing the isolates by PCR with specific primers MKCgF and MKCgR to detect *C. gloeosporioides* and CY1 and CY2 to detect *C. lindemuthianum*. and with universal primers EF1 and 2 and ITS 1 and 4. 45 strains were obtained from 20 different hosts with the which analyzes were performed. The *C. gloeosporioides* species was morphologically identified in avocado, pitahaya, pepper, soursop, tangerine, passion fruit, cocoa, naranjilla, orange, passion fruit, lemon, and bean crops. The *C. gloeosporioides* species was identified in 6 isolates by the BIOLOG microbial identification system and in 33 isolates with the use of the specific primers MKCgF and MKCgR generating 380 bp amplicons; none of the isolates were identified as *C. lindemuthianum*. The universal primers EF 1 and 2 and ITS 1 and 4 generated amplicons at heights of 520 bp and 570 bp respectively, which is corresponding for fungi of the genus *Colletotrichum*.

Keywords: *Colletotrichum*, BIOLOG, morphometric, amplicons.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2019), alrededor del 40% de cultivos alimentarios se pierden al año por presencia de plagas y enfermedades que afectan a plantas. De este 40%, entre el 10 y 23% de pérdidas son resultado de infecciones fúngicas (Stukenbrock y Gurr, 2023). En el año 2019, Ecuador registró que el valor aproximado de pérdida total de cultivos por causa de enfermedades en plantas ascendió a doscientos setenta mil cuatrocientos cinco dólares (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2020).

Hasta el 2017, en Ecuador se ha reportado la presencia de 64 géneros distintos de hongos fitopatógenos de importancia económica por considerarse plagas cuarentenarias presentes dentro del territorio, en este listado se encuentran cuatro especies de hongos pertenecientes al género *Colletotrichum* (Agrocalidad, 2017).

El género de hongos *Colletotrichum* es el causante de enfermedades fitopatógenas en diversos tipos de hospederos (Cai L. et al., 2009). Estos hongos fitopatógenos producen la enfermedad de la antracnosis en cultivos frutales, ornamentales, hortalizas, leguminosas, cereales, tubérculos, entre otros (Freeman et al., 1998) (Marley et al., 2004). Actualmente se tiene conocimiento y registro de 246 especies de hongos correspondientes a este género alrededor del mundo (Schoch CL, et al., 2020) (Sayers EW, et al., 2019).

Justificación del problema

Anualmente Ecuador importa cerca de mil millones de dólares de productos vegetales y de igual manera, cada año se exportan más de seis mil millones de dólares en estos productos, estos incluyen cereales, frutas, leguminosas, semillas, plantas vivas, esquejes, entre otros (Observatorio de Complejidad Económica , 2023). Se destaca la importación de manzana, trigo, cebada, maíz, peras, semillas de café, cebollas, uva y

semillas para siembra; y la exportación de banano, flores, frutas tropicales, café, cacao, follaje vegetal, esquejes, explantes varios, y uva (Observatorio de Complejidad Económica , 2023). En general los productos importados y exportados son susceptibles a infecciones micóticas del género *Colletotrichum*, por ello, la producción, manipulación, transporte, almacenamiento y comercialización de productos vegetales (no procesados) requieren de la planificación e implementación de medidas sanitarias (vigilancia fitosanitaria) para asegurar la inocuidad, sanidad y calidad de los productos, de esta forma, se evita el ingreso de plagas nuevas y el control o erradicación de plagas presentes (endémicas) en nuestro país (Agrocalidad, 2017).

Objetivo del proyecto

Objetivo General

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

Objetivo específico

- 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

Hipótesis

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

Capítulo II: Marco Teórico

Generalidades del Género *Colletotrichum*

Colletotrichum es un género de hongos fitopatógenos con gran importancia para el agro, no solo por el impacto económico que puede llegar a generar una infección de este hongo en un cultivo, sino también por la gran variabilidad genética que tiene este género (Lopes da Silva et al., 2020). Este género fue descrito por primera vez en 1831 por Corda, es el único género de la familia *Glomerellaceae* y todas las especies de este género son endófitos, patógenos o saprobios (Bhunjun et al., 2021).

Su patogenicidad se debe a un gran número de metabolitos secundarios, por ejemplo, las colletotrichinas A–C son las causantes de los síntomas de la enfermedad producida por *Colletotrichum*, esta enfermedad es conocida como antracnosis y puede afectar tanto a cultivos agrícolas como a plantas ornamentales (Moraga et al., 2019).

Morfología

Definir las especies basándose en su morfología es complicado debido a la superposición de caracteres morfológicos en morfos asexuales y también por las variaciones que pueden presentarse según las condiciones de cultivo en las que se aíslan (Bhunjun et al., 2021).

La morfología macroscópica puede variar según el medio que se use para purificar el hongo, el tiempo de crecimiento, la especie que se esté aislando o su patotipo (Aragaw et al., 2023). A los siete días de siembra, las colonias de *Colletotrichum* que son aisladas en agar papa dextrosa (PDA) suelen ser circulares y con micelio aéreo cuyo color va a variar dependiendo de la especie, este puede ser amarillo, blanco, negro, gris, café, verde, naranja, salmón, rosa, violeta o crema; con reverso blanco, negro, gris, café, naranja o crema (Liu et al., 2016).

A nivel microscópico, este género se caracteriza por tener ascomas solitarias o gregarias, globosas, cuyo color puede ir de marrón oscuro a negro. Su pared ascomatal está compuesta de células aplanadas angulares de color marrón. Su hamatecio está compuesto por paráfisis hialinas, septadas, ramificadas en las bases y redondeadas en las puntas. Las ascas contienen 8 esporas, son unitunicadas, cilíndricas y de pedicelo corto. Las ascosporas pueden ser unitarias o biseriadas, son aseptadas, hialinas, de forma lisa, cilíndrica, oval, fusiforme o romboide, rectas o curvas y con extremos redondeados. Los conidiomas son acervulares, los conidióforos van de hialinos a marrón pálido, simples o septados, ramificados o no ramificados y de paredes lisas. Las células conidiógenas enteroblásticas pueden ir de hialinas a marrón pálido, lisas, cilíndricas, elipsoidales o ampuliformes. Los conidios son hialinos, lisos, aseptados, cilíndricos, claviformes, fusiformes, elipsoidales, ovoides, rectos o curvos y un ápice redondeado. Sus apresorios pueden ser únicos o en pequeños grupos, color marrón, globoso, elíptico y claviforme. (Qiao et al., 2021).

Clasificación

El género *Colletotrichum* es altamente diverso y abarca una amplia variedad de especies con características diversas. Durante mucho tiempo, se consideró que *Colletotrichum* era un solo género con múltiples especies, sin embargo, los avances en taxonomía molecular revelaron que varias especies de *Colletotrichum* exhibían una alta variabilidad, razón por la cual, las especies de este género pueden ser clasificados en complejos de especies (Cannon et al., 2012). Hasta el 2021 se reconocieron quince complejos de *Colletotrichum*: *acutatum*, *agaves*, *boninense*, *caudatum*, *dematium*, *destructivum*, *dracaenophilum*, *gigasporum*, *gloeosporioides*, *graminicola*, *magnum*, *orbiculare*, *orchidearum*, *spaethianum* y *truncatum* (Talhinhas y Baroncelli, 2021). Los complejos *acutatum*, *boninense*, *destructivum*, *gloeosporioides*, *orchidearum*, *spaethianum* y *truncatum* se distinguen por poseer especies capaces de infectar a una gran cantidad cultivos vegetales; por el contrario, las especies *C. graminicola* y *C. gigasporum*, pertenecientes a los complejos *graminicola* y *gigasporum*

respectivamente, han sido encontrados como causantes de infecciones en humanos (Lopes da Silva et al., 2020).

Complejo *acutatum*. Está compuesto por cuarenta y una especies que atacan principalmente a plantas como frutilla, manzana, oliva, arándano, cítricos y pino, causando mayores daños en la fruta, sin embargo, también afecta la corona del tallo, raíces y hojas (Baroncelli et al., 2017).

Complejo *agaves*. Está compuesto por cinco especies con pocos reportes; *C. agave* ha sido el más reportado hasta ahora y se ha encontrado mayormente en *Agave spp.* (Bhunjun et al., 2021).

Complejo *boninense*. Está compuesto por veinte y seis especies, atacan una amplia variedad de cultivos, amaralidáceas, cucurbitáceas, orquidáceas, pasifloráceas, rosáceas, entre otras; afecta principalmente a frutos y hojas (Damm U. et al., 2012).

Complejo *caudatum*. Está compuesto por ocho especies que son patogénicas únicamente en hospederos monocotiledóneos, cuatro de ellos han sido reportados como patógenos en poaceas, mientras que *C. caudisporum*, *C. duyumense* y *C. ochraceae* han sido reportados como patógenos en orquídeas (Crouch, 2014) (Tao et al., 2013).

Complejo *dematium*. Está compuesto por diecisiete especies, afectan mayormente a eudicotiledóneas causando antracnosis en hojas y tallos (Talhinhas y Baroncelli, 2021).

Complejo *destructivum*. Está compuesto por veinte especies, las más comunes son *C. destructivum*, *C. lini* y *C. higginsianum*; afectan asteráceas, poaceas, fabáceas, cucurbitáceas, apiáceas, lamináceas, entre otras (Damm et al., 2014).

Complejo *dracaenophilum*. Está compuesto por ocho especies (Damm et al., 2019), se han encontrado únicamente en nueve especies de plantas de tipo orquidáceas, rutáceas, icacináceas y buxáceas (Talhinhas y Baroncelli, 2021).

Complejo *gigasporum*. Está compuesto por ocho especies, es el complejo menos común del género, se han descrito como huéspedes de orquídeas, café y té (Liu et al., 2014).

La especie *C. gigasporum* se encuentra mayormente en regiones tropicales siendo un patógeno secundario en cultivos de piña (Costa et al., 2019), café (Cristobal et al., 2017) y mango (Li et al., 2019).

Complejo *gloeosporioides*. Está compuesto por cincuenta y siete especies, la mayoría son patogénicas (Jayawardena et al., 2016). Atacan a más de 280 especies, la mayoría eudicotiledóneas y en menor cantidad a monocotiledóneas y gimnospermas (Talhinhas y Baroncelli, 2021). En el 2012, Weir *et al.*, reconoce dos subclados dentro de este complejo de especies, el subclado *musae* y el subclado *kahawae*.

Complejo *graminicola*. Está compuesto por dieciséis especies que se han encontrado mayormente asociadas a pastos (*Poaceae*) y algunas orquídeas (*Orquidaceae*) (Jayawardena et al., 2016).

Complejo *magnum*. Está compuesto por ocho especies, la mayoría de ellos reportados una sola vez, con excepción de *C. brevisporum* que ataca alrededor de 20 especies de plantas distintas y se ha encontrado en Asia, Oceanía y América del Sur (Damm et al., 2019).

Complejo *orbiculare*. Está compuesto por ocho especies, son hemibiotrofos que infectan cultivos de gran importancia económica como son el maíz, algodón, arroz, sorgo, soja y trigo; y de igual manera a malezas que crecen a su alrededor (Damm U. et al., 2013).

Complejo *orchidearum*. Está compuesto por ocho especies, se ha encontrado que atacan a 35 especies distintas de plantas, tanto eudicotiledóneas como monocotiledóneas (Damm et al., 2019). Especies como *C. sojae*, *C. plurivorum* y *C. musicola* han sido reportadas como patógenos importantes en cultivos de soja (Rogério et al., 2020).

Complejo *spaethianum*. Está compuesto por nueve especies que están asociadas a 37 especies de plantas, la mayoría monocotiledóneas, pero no infectan pastos (Cannon et al., 2012).

Complejo *truncatum*. Está compuesto por cuatro especies, asociadas a 56 especies de plantas, mayormente eudicotiledóneas (Niu et al., 2016). La especie más representativa *C.*

truncatum es de relevancia económica ya que afecta en gran medida a fabáceas y solanáceas (Damm et al., 2009).

Plantas hospederas

El género *Colletotrichum* ha sido hallado especialmente en plantas dicotiledóneas, no obstante, los complejos de especies *caudatum*, *graminicola* y *spaethianum* son más comunes en monocotiledóneas (Talhinhas y Baroncelli, 2021).

Algunas especies de *Colletotrichum* pueden infectar un solo hospedero, por ejemplo, la frutilla (*Fragaria*) puede ser infectada por *C. acutatum*, *C. fragariae*, y *C. gloeosporioides*; del mismo modo, un solo hospedero puede ser infectado por varias especies de *Colletotrichum*, por ejemplo, *C. gloeosporioides* puede infectar diversos cultivos como almendra, aguacate, manzana, fresa, limón, entre otros (Freeman y Shabi, 1996) (Freeman et al., 1998).

Talhinhas y Baroncelli, (2021), presentan que *C. siamense* y *C. gloeosporioides* (Tabla 1), son las especies con mayor número de hospederos con 103 y 87 hospedantes respectivamente. El complejo *gloeosporioides* es el grupo con más asociaciones especie-huésped, con un total de 516 (Tabla 2). Los complejos *acutatum*, *gloeosporioides* y *truncatum* tienen más de siete especies huésped por cada especie de *Colletotrichum*, mientras que los complejos *agaves*, *caudatum*, *dracaenophilum* y *graminicola* tienen entre una y dos especies huésped en promedio (Tabla 2). Respecto a las familias huésped (Tabla 3), la familia *Fabaceae* tiene el mayor número de especies hospedantes de *Colletotrichum*, con 51 especies huésped, seguida de la familia *Poaceae* con 42 hospedantes. Las familias *Orchidaceae*, *Asparagaceae* y *Rosaceae* también albergan un número significativo de especies de *Colletotrichum* (Tabla 3). Sin embargo, dentro de la familia *Rosaceae* es donde se encuentra el mayor número de asociaciones especie-huésped de *Colletotrichum*, con 118 registros (Tabla 3). El complejo *graminicola*, seguido del complejo *caudatum*, es el más común en la familia *Poaceae* y el complejo *boninense* es predominante en la familia *Orchidaceae*.

Tabla 1

*Las diez especies de **Colletotrichum** con el mayor número de hospederos*

Especies	Complejo	Número de hospederos
<i>C. siamense</i>	<i>Gloeosporioides</i>	103
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Gloeosporioides</i>	87
<i>C. foriniae</i>	<i>Acutatum</i>	73
<i>C. karsti</i>	<i>Boninense</i>	63
<i>C. fructicola</i>	<i>Gloeosporioides</i>	63
<i>C. truncatum</i>	<i>Truncatum</i>	52
<i>C. nymphaeae</i>	<i>Acutatum</i>	42
<i>C. acutatum</i>	<i>Acutatum</i>	40
<i>C. theobromicola</i>	<i>Gloeosporioides</i>	31
<i>C. tropicale</i>	<i>Gloeosporioides</i>	31

*Nota. De **Colletotrichum** species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status, Talhinhos, P., y Barancelli, R., 2021, *Fungal Diversity* (pp.109-198)*

<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13225-021-00491-9>

Tabla 2

*Número de combinaciones de especies de **Colletotrichum** - huésped por complejo*

Complejo	Número de especies	Número de Combinaciones de especies de <i>Colletotrichum</i> - huésped	Proporción Combinaciones/especies de <i>Colletotrichum</i>
<i>acutatum</i>	41	295	7.2
<i>agaves</i>	5	8	1.6
<i>boninense</i>	26	129	5.0
<i>caudatum</i>	8	9	1.1
<i>dematium</i>	17	37	2.2
<i>destructivum</i>	20	57	2.9
<i>dracaenophilum</i>	8	10	1.3
<i>gigasporum</i>	8	15	1.9
<i>gloeosporioides</i>	57	516	9.1
<i>graminicola</i>	16	31	2.0

Complejo	Número de especies	Número de Combinaciones de especies de <i>Colletotrichum</i> - huésped	Proporción Combinaciones/especies de <i>Colletotrichum</i>
<i>magnum</i>	8	30	3.8
<i>orbiculare</i>	8	20	2.5
<i>orchidearum</i>	8	41	5.1
<i>spaethianum</i>	9	52	5.8
<i>truncatum</i>	4	58	14.5
<i>acutatum</i>	41	295	7.2

Nota. De *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status, Talhinhas, P., y Baroncelli, R., 2021, *Fungal Diversity* (pp.109-198)

<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13225-021-00491-9>

Tabla 3

Número de especies hospedantes, de combinaciones hongo-huésped y número de especies y complejos de especies de Colletotrichum por familia hospedante

Familia	Número de especies de huéspedes	Número de Combinaciones de especies de <i>Colletotrichum</i> - huésped	Número de complejos de especies	Número de especies de <i>Colletotrichum</i>
<i>Rosaceae</i>	33	118	7	41
<i>Fabaceae</i>	51	87	11	36
<i>Solanaceae</i>	14	72	10	41
<i>Rutaceae</i>	24	63	7	31
<i>Orchidaceae</i>	28	59	9	36
<i>Poaceae</i>	42	53	5	32
<i>Anacardiaceae</i>	8	42	6	23
<i>Asparagaceae</i>	32	42	8	20
<i>Theaceae</i>	6	33	5	20
<i>Proteaceae</i>	17	33	4	15
<i>Myrtaceae</i>	16	32	3	23

Familia	Número de especies de huéspedes	Número de Combinaciones de especies de <i>Colletotrichum</i> - huésped	Número de complejos de especies	Número de especies de <i>Colletotrichum</i>
<i>Asteraceae</i>	26	30	9	22
<i>Malvaceae</i>	14	30	8	18
<i>Euphorbiaceae</i>	11	28	6	19
<i>Rubiaceae</i>	6	27	6	22
<i>Amaryllidaceae</i>	12	26	6	17
<i>Lauraceae</i>	6	23	3	19
<i>Oleaceae</i>	8	22	4	17
<i>Ericaceae</i>	7	19	3	11
<i>Vitaceae</i>	6	18	4	14
<i>Lamiaceae</i>	12	17	4	13
<i>Moraceae</i>	8	15	5	10
<i>Musaceae</i>	5	14	3	10
<i>Arecaceae</i>	5	13	3	10
<i>Caricaceae</i>	1	12	6	12
<i>Apiaceae</i>	6	12	6	12

Nota. De *Colletotrichum species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status*, Talhinhos, P., y Barancelli, R., 2021, *Fungal Diversity* (pp.109-198)

<https://doi.org/10.1007/s13225-021-00491-9>

Ciclo de crecimiento

El ciclo de vida de los hongos del género *Colletotrichum* incluye una fase sexual, que proporciona variabilidad genética, y asexual, durante la cual se dispersa el hongo (Beltrán y García, 2006). La fase asexual del género *Colletotrichum* ha sido ampliamente estudiada, ya que es asociada comúnmente con síntomas de enfermedades (Jayawardena et al., 2016). Su ciclo de vida se completa cuando los morfos asexuales desarrollan una estructura llamada acérvulo dentro del tejido vegetal (Khan y Hsiang, 2003). Conforme el micelio fúngico crece

entre la epidermis vegetal y la cutícula de la planta, la tensión sobre la cutícula aumenta, lo que provoca su ruptura y exposición del acérvulo maduro al ambiente (Sutton, 1992). Los conidios, que se producen a partir de conidióforos en el acérvulo, están rodeados por una matriz mucilaginosa soluble en agua, compuesta de glicoproteína e inhibidores de germinación que protege a los conidios de la desecación y las toxinas producidas por el mecanismo de defensa de la planta huésped (Leite y Nicholson, 1992). Los conidios son capaces de diseminarse a través del agua y el viento, sirviendo como fuente primaria de infección para el próximo ciclo (Ntahimpera et al., 1997).

Es poco común que el género *Colletotrichum* forme su fase sexual, aun así, suele suceder en mayor medida con especies de los complejos *boninense*, *dracaenophilum*, *gloeosporioides*, *graminicola* y *orchidearum* (Damm U. et al., 2012) (Damm et al., 2019). Los morfos sexuales pueden actuar como cuerpos de supervivencia, permitiendo al hongo resistir condiciones extremas (Menat et al., 2016).

Sintomatología

Los síntomas de la enfermedad causada por *Colletotrichum* pueden suceder en cualquier parte de la planta, en tallos, hojas, flores o frutos (de Aguiar Carraro et al., 2022). Los síntomas incluyen lesiones o manchas hundidas y de color negro con masas de esporas o acérvulos, necrosamiento de tejido, pudrición del pedúnculo de frutos y marchitamiento las puntas de ramas (Zakaria et al., 2009).

Cuando las manchas se empapan de agua, se expanden rápidamente sobre el tejido vegetal, volviéndolo blando y cambiando su color, desde marrón rojizo, tostado o negro existe una variación en los síntomas dependiendo de la especie que esté infectando la planta, las manchas pueden ser redondas, ovaladas, regulares o irregulares, las lesiones pueden limitarse a las nervaduras en algunos casos (Gautam, 2014).

Biología y ecología

El género *Colletotrichum* necesita una temperatura de entre 26 a 32°C y una humedad relativa de entre 99 y 100% para crecer y esporular (Beltrán y García, 2006). Este hongo ha desarrollado diversos mecanismos de infección para poder colonizar a su hospedero, teniendo la facultad de llevar un ciclo de vida endófito, hemibiotrófico, necrotrofico, latente o quiescente (De Silva et al., 2017).

Estilo de vida biotrófico y hemibiotrófico. El patógeno vive dentro del tejido de la planta viva, absorbe nutrientes sin matar las células de la planta (da Silva et al., *Colletotrichum: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability*, 2020), de manera que la planta no genera una respuesta de defensa (Tang et al., 2018). *Colletotrichum* no es considerado un patógeno biotrófico verdadero, no obstante, algunas especies pueden tener este comportamiento durante su ciclo de vida seguido de un estilo de vida necrotrofico, a este comportamiento se lo denomina como hemibiotrófico (Cannon et al., 2012). La fase biotrófica puede durar de 1 a 3 días mientras infecta el tejido vegetal, después de este tiempo llega la fase necrotrofica que termina con la muerte de la planta (Jayawardena et al., 2021).

Estilo de vida endófito. El hongo es capaz de vivir en las células vegetales sin causar síntomas de enfermedad, la relación hongo-hospedero puede ser mutualista, antagonista o patogénica dependiendo del estado fisiológico, genotipo o condiciones bajo las que está la planta (da Silva et al., 2020). Algunas especies patógenas de *Colletotrichum* son endófitos asintomáticos que pueden tener una interacción mutualista con su hospedante, proveyéndole de resistencia a enfermedades y sequías y mejoras en el crecimiento (Busby et al., 2016) (Jayawardena et al., 2021).

Estilo de vida necrotrofico. La mayoría de las especies de *Colletotrichum* desarrollan una fase necrotrofica en su ciclo de vidas (Cannon et al., 2012), durante esta fase el hongo coloniza e infecta las células de las plantas, produciendo muerte celular y manifestando síntomas de enfermedad, el hongo es capaz de sobrevivir en el tejido muerto (Gan et al., 2013).

Estilo de vida quiescente o latente. Algunos autores no lo consideran un estilo de vida, si no más bien una fase en la que el hongo pasa de estar inactivo dentro del huésped a estar activo (De Silva et al., 2017). Este estilo de vida es importante en hogos causantes de enfermedades post cosecha, como es el caso de *Colletotrichum gloeosporioides*, *acutatum* o *truncatum* (Jayawardena et al., 2021).

Especies cuarentenarias presentes en el Ecuador

Las especies de organismos fitopatógenos presentes en Ecuador pueden ser encontrados en la Resolución 0122, expedida por el Ministerio de Agricultura y Ganadería en el año 2017, en esta última actualización del listado se reportan las plagas cuarentenarias presentes y no presentes en el país; se reporta la presencia de únicamente dos especies de hongos pertenecientes al género *Colletotrichum* (Agrocalidad, 2017).

Tabla 4

Listado de especies cuarentenarias de ***Colletotrichum*** presentes y no presentes en Ecuador

Especies de <i>Colletotrichum</i> cuarentenarias no presentes	Especies de <i>Colletotrichum</i> cuarentenarias presentes
<i>Colletotrichum capsici</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioide</i>
<i>Colletotrichum circinans</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
<i>Colletotrichum coccodes</i>	
<i>Colletotrichum coffeanum</i>	
<i>Colletotrichum dematium</i>	
<i>Colletotrichum destructivum</i>	
<i>Colletotrichum fragariae</i>	
<i>Colletotrichum graminicola</i>	
<i>Colletotrichum kahawae</i>	
<i>Colletotrichum lagenaria</i>	
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	
<i>Colletotrichum sublineolum</i>	

Nota. Adaptado de Resolución 0122. Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2017.

Métodos de Identificación de *Colletotrichum*

Existen varios métodos de identificación de hongos, estos métodos se basan en características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas de los hongos.

Observación macroscópica. Involucra el análisis cualitativo de las características visibles sin necesidad de un microscopio. Estas características son el tamaño, forma, color, textura de una colonia (Pérez Castro et al., 2003).

Observación microscópica. Este método incluye el uso de un microscopio para la observación de esporas, conidios, estructuras reproductivas y características celulares, como la presencia de septos, vesículas, hifas y otros detalles microscópicos (Pérez Castro et al., 2003).

Cultivo en medio. Los hongos pueden ser cultivados en medios de cultivo, como agar Sabouraud, agar malta, agar PDA (papa dextrosa agar), entre otros. La observación de las características del crecimiento, como la velocidad, el color de las colonias, la textura y la morfología de las estructuras reproductivas, puede ser útil para la identificación (Cai L. et al., 2009).

Pruebas bioquímicas. Se pueden utilizar diversas pruebas bioquímicas para la identificación de hongos. Estas pruebas implican la evaluación de características bioquímicas específicas, como la capacidad de fermentación de carbohidratos, producción de enzimas, reacciones de hidrólisis y otros procesos metabólicos (Wei et al., 2021).

Análisis molecular. El análisis molecular se ha vuelto cada vez más importante en la identificación precisa de hongos. La secuenciación del ADN, en particular del gen ribosomal 18S, 28S y del espaciador transcripcional interno (ITS), ha demostrado ser una herramienta muy efectiva para la identificación de especies de hongos (Liu et al., 2022) (Cano et al., 2004).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Instituciones participantes

Este proyecto de titulación se realizó desde el 23 de mayo del 2023 hasta el 19 de agosto del 2023, mediante el convenio existente entre la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario AGROCALIDAD.

Colaboradores científicos

Francisco J. Flores Flor, PhD

Tutor de Tesis

Ing. Jairo L. Guevara Andrade

Analista del laboratorio de

Fitopatología, AGROCALIDAD

Área de Estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, en la sede de Tumbaco, en Pichincha, en la dirección Eloy Alfaro y Federico González Suarez. Av. Interoceánica Km.14 1/2, Sector La Granja, coordenadas: longitud 78.41142593090561 y latitud -0.2145009767230452.

Material Biológico

Se analizaron 50 muestras vegetales provenientes de las dependencias de AGROCALIDAD presentes en Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Pastaza, Tungurahua, Imbabura, Guayas y Pichincha (Tabla 5). El material vegetal se transportó envuelto en una toalla de papel dentro de una bolsa de papel y correctamente rotulada, manteniendo una cadena de frío hasta llegar al laboratorio, una vez allí, se seleccionaron las muestras que presentaban sintomatología asociada con infecciones de *Colletotrichum*, incluyendo la presencia de manchas de necrosamiento en hojas, tallos y frutos (Figura 1).

Tabla 5

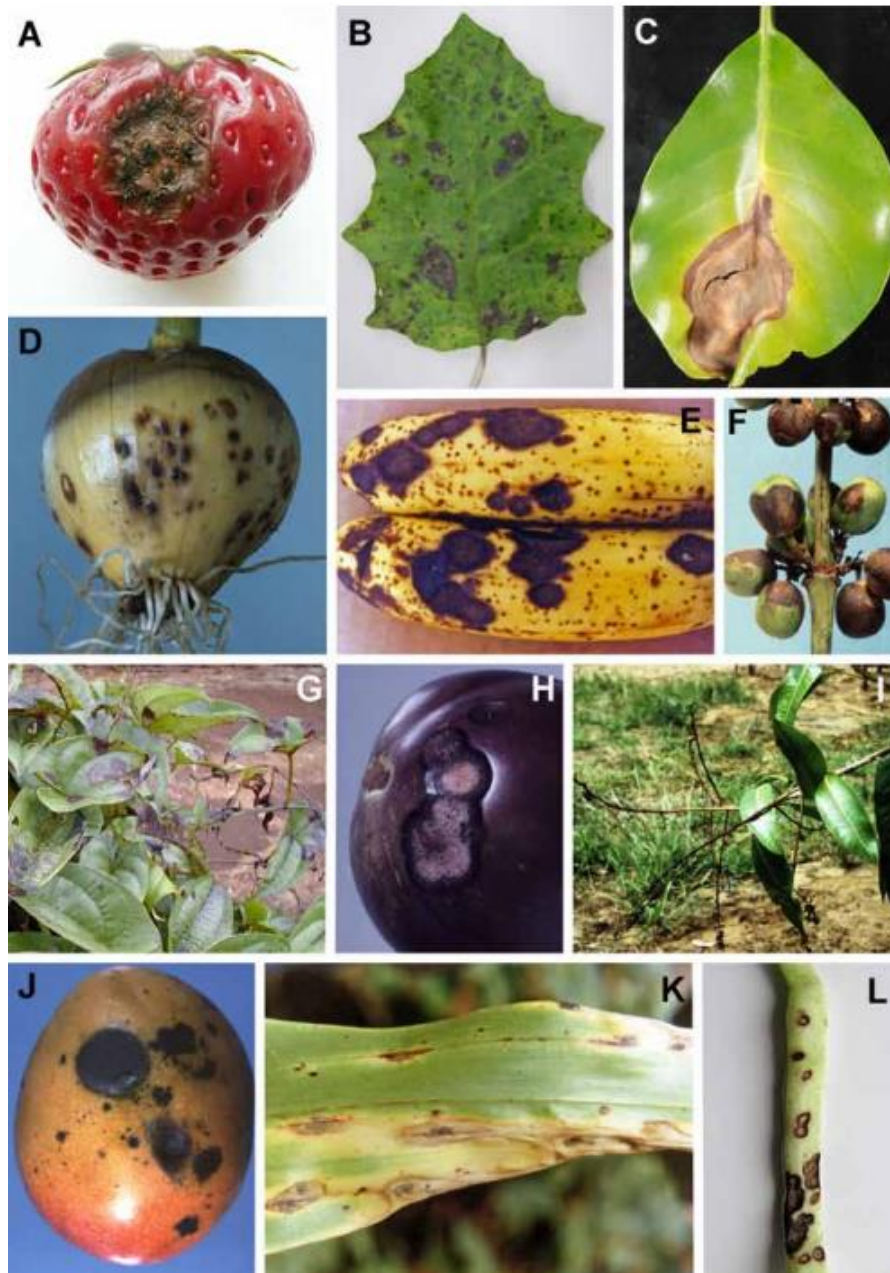
*Muestras seleccionadas para el análisis de **Colletotrichum**, con su procedencia y cultivo afectado*

Muestra	Cultivo
FP-23-257	Cacao
FP-23-286	Frejol
FP-23-287	Haba
FP-23-361	Cacao
FP-23-362	Cacao
FP-23-363	Cacao
FP-23-367	Cacao
FP-23-368	Cacao
FP-23-415	Maní
FP-23-416	Maní
FP-23-430	Aguacate
FP-23-643	Café
FP-23-644	Café
FP-23-645	Cacao
FP-23-646	Cacao
FP-23-649	Tomate de árbol
FP-23-650	Frejol
FP-23-651	Tomate de árbol
FP-23-665	Tomate de árbol
FP-23-666	Tomate de árbol
FP-23-677	Café
FP-23-683	Haba
FP-23-691	Caña
FP-23-692	Naranjilla
FP-23-742	Maracuyá
FP-23-743	Maracuyá
FP-23-746	Maracuyá
FP-23-747	Maracuyá
FP-23-768	Limón

Muestra	Cultivo
FP-23-769	Limón
FP-23-0857	Limón
FP-23-0854	Granadilla
FP-23-0851	Apio
FP-23-0856	Mora
FP-23-0858	Mandarina
FP-23-0859	Ají
FP-23-0860	Pimiento
FP-23-0852	Aguacate
FP-23-0853	Aguacate
FP-23-0855	Café
FP-23-0857	Limón
FP-23-0833	Pitahaya
FP-23-0817	Naranja
FP-23-0818	Naranja
FP-23-0819	Naranja

Figura 1

Síntomas de enfermedad causados por distintas especies de *Colletotrichum*



Nota. De *Colletotrichum*: complexes species or species complexes? Ulrike D., Cannon P. y Crous P., 2012, *Studies in Mycology* (pp.1-2013).

Aislamiento, purificación y masificación

Se siguió el método de aislamiento, purificación y masificación que se realiza en el Laboratorio de Fitopatología de Agrocalidad.

Siembra de material vegetal y aislados preservados

Se preparó 39 g/L de medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se esterilizó en una autoclave a una temperatura de 121°C y 20 PSI por 15 minutos. Al retirar de la autoclave, se dejó enfriar el medio hasta una temperatura de 56°C y se añadió 3 g/L de Oxitetraciclina al 0,16%. En una cámara de flujo, se dispensó el medio en cajas Petri de vidrio previamente esterilizadas, se colocó aproximadamente 20 mL de medio por cada caja, se dejó reposar hasta que enfríe y se conservaron a 4°C hasta su uso (Wet y Brink, 2021).

Antes de aislar el patógeno, se preparó la cámara de flujo laminar para la siembra. Se dejó el medio de cultivo PDA, cajas Petri, agua destilada estéril, hipoclorito de sodio al 2,5%, toallas de papel, mechero, un marcador punta fina y tijeras, pinzas y cuchillas estériles dentro de la cámara de flujo laminar con la luz UV prendida durante 5 minutos (Zepeda et al., 2013).

Para aislar el patógeno, se cortaron trozos pequeños del tejido que presentaba lesiones bien desarrolladas, típicamente causadas por *Colletotrichum*, con una tijera o cuchilla estéril. Se colocaron los trozos en una caja Petri y se añadió hipoclorito de sodio al 2,5% hasta cubrirlos. Se dejó reposar durante 3 minutos y posteriormente se realizaron 2 enjuagues con agua destilada estéril. Los trozos lavados se colocaron sobre toallas de papel estériles durante 10 minutos para que se sequen. Una vez que las muestras estuvieron secas, se tomaron los pedazos de tejido con las pinzas estériles y se sembraron en el medio de cultivo PDA con el antibiótico oxitetraciclina al 0,16%, este proceso se realizó cerca del mechero. En cada caja se colocaron cuatro explantes y se sembraron 2 cajas por cada muestra. Las cajas se incubaron a 24°C por 8 días (Castellanos et al., 2011).

Purificación de cultivos

Sé observó la placa anteriormente sembrada con tejido enfermo bajo un estereomicroscopio. Se identificaron los acérvulos color salmón característicos de *Colletotrichum* (Castellanos et al., 2011). Con un alfiler flameado se tomó una pequeña muestra de hifas y esporas de la placa, de forma que a la punta del alfiler quedara adherida la masa de conidias del acérvulo elegido. Se picó el alfiler con muestra de hifa en una caja petrí con PDA con el antibiótico oxitetraciclina al 0,16% nueva para asegurar que la caja haya sido inoculada (Smith y Moss, 1985). Se realizaron 2 repeticiones por cada muestra. Las cajas se incubaron a 24°C por 8 días (Castellanos et al., 2011) . El proceso se repitió hasta obtener cepas puras de *Colletotrichum*.

Masificación de micelio

Para la masificación de micelio se preparó y esterilizó 100 mL de medio líquido (2g de dextrosa + 0,5g de extracto de levadura + 0,5g de peptona + 100 mL de agua destilada) en un matraz. Se seleccionó un aislado totalmente puro y esporulado. Se cortó un trozo circular de aproximadamente 1 cm de diámetro del medio de cultivo con micelio puro. El pedazo se introdujo en el medio líquido estéril, se selló y se incubó en la oscuridad, a temperatura ambiente por 8 días (Castellanos et al., 2011). Se filtró y lavó el micelio obtenido usando una bomba de vacío. Se conservó el micelio en un tubo Falcon de 50 mL a -20°C para su posterior uso.

Identificación morfológica macroscópica y microscópica del hongo aislado

La morfología macroscópica se analizó observando las características de crecimiento de las colonias de cada cepa obtenida (color, forma, tamaño e hifa) después de los 7 días de incubación a 24°C (Alsohaili y Bani-Hasan, 2018).

Para el análisis microscópico se realizó una impronta de cada aislado obtenido. Con un asa micológica estéril se recogió micelio directamente de la caja con aislado puro y se frotó sobre un portaobjetos. Se distribuyó una gota de azul de lactofenol sobre el frotis y se colocó

un cubreobjetos encima (Alegbede y Lateef, 2018). Las placas preparadas fueron observadas en el microscopio óptico Olympus IEEE 1394 a 40x y se realizaron mediciones del largo y ancho de las conidias en el programa cellSens Standard 1.16 de OLYMPUS CORPORATION. Las medias de las magnitudes medidas (largo y ancho) se compararon con bibliografía para identificar morfológicamente a los aislados. Se realizó un análisis ANOVA y Tukey al 95% para determinar diferencias significativas en el tamaño de las conidias de hongos presentes en el mismo y diferente hospedero.

Identificación Metabólica

El ensayo de identificación metabólica se realizó siguiendo la metodología descrita en el manual “FF MicroPlate™ Instructions for Use” del Sistema de Identificación Microbiana BIOLOG para la identificación de hongos y levaduras.

Preparación antes del ensayo

Anticipadamente a realizar el ensayo, se cultivó e incubó el hongo en agar extracto de malta 2% (MEA) de 5 a 10 días a 24°C hasta obtener esporulación. Todo el ensayo se realizó en una cabina de flujo laminar tipo II para evitar la contaminación, de igual manera, el material utilizado fue previamente esterilizado (hisopos, pinzas, puntas) o desinfectado (Microplacas, tubos de inoculación y pocillos) según la naturaleza de este. Antes de preparar el inóculo se estableció un rango de turbidez aceptable en el turbidímetro, se ajustó la transmitancia al 100% con un tubo de agua o un tubo de inoculación (FF-IF) sin inocular, se comprobó el ajuste con el estándar de turbidez al 75% de BIOLOG (BIOLOG, 2010).

Preparación y siembra del inóculo

Para preparar el inóculo se midió la transmitancia del tubo FF-IF que se usaría y se ajustó al 100% cuando fue necesario (los tubos no son ópticamente uniformes por lo su transmitancia debió ser ajustada al 100% individualmente antes de cada uso). Con un hisopo estéril se tomó micelio directamente de la placa de agar, cuidando de no tomar restos del medio

en el proceso, se sumergió el hisopo en el tubo FF-IF para humedecerlo, posteriormente se presionó y giró el hisopo contra el área interior seca del tubo de vidrio y por encima del fluido, para así separar y liberar las esporas en el fluido de inoculación. A continuación, se midió la transmitancia del tubo inoculado, la inoculación en el tubo FF-IF se repitió hasta que el tubo llegó a una transmitancia de 75% (+/- 2%). Por último, con ayuda de una pipeta multicanal, se colocaron 100 µL de inóculo en cada uno de los pocillos de la microplaca FF MicroPlate™ de BIOLOG. La microplaca se incubó a 26°C de 1 a 7 días. Se realizó el mismo proceso para cada una de las cepas aisladas de *Colletotrichum* (BIOLOG, 2010).

Lectura de la microplaca y resultados

La lectura de la microplaca se realizó en el lector Biolog Micro Station™ con el software MicroLog 3, a una longitud de onda dual de 490 nm (parámetro colorimétrico) y de 750 nm (parámetro de turbidez). La lectura de la microplaca se realizó diariamente durante 7 días consecutivos (BIOLOG, 2010).

Identificación molecular del hongo aislado

Para la identificación molecular del hongo aislado se siguió el protocolo establecido en Agrocalidad.

Extracción de ADN mediante kit comercial para su uso en la secuenciación

La extracción de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del kit DNeasy® Plant Mini Kit de Thermo Scientific (QIAGEN, 2016).

Previo a la extracción. Se homogeneizó las soluciones de tampón AP1 y tampón AW1. Se agregó etanol a los concentrados de tampón AW1 y tampón AW2. Se precalentó agua a 65°C (QIAGEN, 2016).

Extracción de ADN. Se maceró con nitrógeno líquido el micelio obtenido anteriormente en la masificación, se colocó la muestra en un tubo eppendorf estéril. Se añadió 400 µl de tampón AP1 y 4 µl de RNase A, se homogenizó en un vortex y se incubó por 10 minutos a

65°C, cada 3 minutos se invirtió el tubo. Se añadió 130 µl de tampón P3, se mezcló e incubó por 5 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó el tubo por 5 minutos a 21000 x g. Se transfirió el sobrenadante a una columna QIAshredder de 2 mL y se centrifugó por 2 minutos a 21000 x g. Se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo, con cuidado de no perturbar el pellet que se formó. En el nuevo tubo se añadió 1,5 mL de tampón AW1 y se homogenizó con la pipeta. Se trasladó 650 µl de la mezcla a una columna DNeasy Mini, se centrifugó por 1 minuto a 7000 x g y después se desechó el sobrenadante. Se colocó la columna en un nuevo tubo de 2 mL, se añadió 500 µl de tampón AW2, se centrifugó por 1 minuto a 7000 x g y se descartó el sobrenadante, se agregaron otros 500 µl de tampón AW2 y se volvió a centrifugar por 2 minutos a 21000 x g. Se trasladó la columna a un nuevo tubo de 2 mL, se añadió 100 µl de tampón AE para elución, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 7000 x g, este proceso se repitió hasta tener un pellet de ADN (QIAGEN, 2016).

Cuantificación del ADN

Previo a la cuantificación del ADN en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, se diluyó el pellet de ADN obtenido en 100 µl de agua libre de nucleasas (DEPC). Se limpió el equipo colocando 2 µl de agua DEPC en el pedestal por 5 minutos. Para la lectura, se abrió la aplicación de ácido nucleico y se colocó 2 µl de agua DEPC que se leyó como blanco. Se limpió el pedestal y se colocó 2 µl de la muestra anteriormente preparada para determinar la concentración y pureza del ADN genómico obtenido, a una longitud de onda de 260/280 nm (Thermo Scientific, 2010).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la identificación de las especies de *Colletotrichum* en las muestras analizadas, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se diluyó el ADN obtenido en agua DEPC hasta llegar a una concentración de 30 ng/µL. Se preparó 50 µL de solución stock de cebadores con concentración 25 µM. Las concentraciones de los reactivos utilizados para preparar la Master Mix y el programa empleado para la PCR dependieron del cebador utilizado.

Amplificación con ITS y EF 1 α . Se amplificó la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) y con los cebadores universales ITS 1 e ITS 4 y también utilizando el factor de elongación 1 alfa (tabla 6). Se realizó la reacción PCR bajo las condiciones descritas en la tabla 7 y con un programa de termociclaje como muestra la tabla 8.

Tabla 6

*Cebadores evaluados para la amplificación de la región interna transcrita para la detección del género **Colletotrichum***

Cebador	Secuencia	Bibliografía
ITS 1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White et al. (1990)
ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
EF 1-F	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'	Jimenez et al. (2022)
EF 1-R	5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'	

Nota. Adaptado de *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*, White, T., P., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J., 1990, en M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, y T. White, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (pp. 315-322). Academic Press. Adaptado de Análisis filogenético de aislamientos patogénicos de la familia Botryosphaeriaceae en cacao., Jimenez, W., Ramírez, A., López, J., y Alvarez, A., 2022, *Revista Ciencia y Tecnología OJS*. (pp.43-52)

Tabla 7

Componentes de la Master Mix usados en las reacciones PCR para la amplificación de la región interna transcrita con los cebadores universales ITS 1 e ITS 4 y EF 1.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para una reacción (μ L)
H2O	-	-	19,6
PCR Buffer	5X	1X	10
dNTP's	10 mM	0,2 mM	1,0

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para una reacción (µL)
ITS 1/ EF1-F	10 µM	0,5 µM	2,5
ITS 4/ EF1-R	10 µM	0,5 µM	2,5
Taq polymerase	5 U /µL	1U/50µL	0,4
Platinum	5X	1X	10
cDNA	-	-	2,0
Volumen total			50

Tabla 8

Parámetros de amplificación por PCR usando ITS 1 e ITS 4

Ciclos PCR	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	1	95	2
Desnaturalización		95	1
Anillamiento	34	50	0,5
Extensión		72	2
Extensión final	1	72	10
Número de ciclos	36		

Nota. Adaptado de *Differential molecular diagnosis Colletotrichum gloeosporioides and Fusarium oxysporum in yam (Dioscorea sp.)*, White, T., P., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J., 1990, en M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, y T. White, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (pp. 315-322). Academic Press.

Electroforesis

Antes de realizar la electroforesis, se preparó una solución de EDTA al 0.5 M, para ello se diluyó 18.61 g de EDTA en 100mL de agua destilada tipo I, se ajustó el pH a 8.0, se esterilizó y se conservó a 4°C. La solución fue utilizada para preparar TBE 5X. En 1 L de agua

destilada tipo I se añadieron 54 g de Tris-base, 27.5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0.5 M, se ajustó el pH a 8.3, se esterilizó y se conservó a 4°C (Wiley, 1991).

Para realizar la electroforesis, se preparó 2 L de TBE 0,5 X, para ello se mezcló 200 mL de TBE 5 X con 1800 mL de agua destilada tipo I. Se preparó 100 mL de gel de agarosa al 1.5% disolviendo 1.5 g de agarosa en 100 mL de TBE 0.5 X. Una vez disuelta la agarosa, se dejó enfriar y se añadió 3 µL de Lonza™ GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain. (Lonza, 2012). Se vertió el gel de agarosa al 1.5% en el molde para el gel con un peine de 17 dientes para crear los pocillos y se esperó 20 minutos hasta su polimerización. Después de este tiempo, se retiró el peine y se llenó la cámara de electroforesis con el TBE 0.5 X hasta cubrir el gel. Se ubicaron los pocillos de carga en dirección al cátodo para permitir la migración del ADN hacia el ánodo. Para cargar el gel, se preparó una mezcla con 4 µL del producto PCR de cada muestra y 1 µL de Blue Juice™ Gel Loading Buffer (10X) de Invitrogen que fueron posteriormente dispensados en cada pocillo. Se cargaron 5 µL del marcador de peso molecular, así como los controles positivo y negativo. La fuente de alimentación se programó a 100V por un período de 30-45 minutos. Posteriormente, los amplicones resultantes de los productos PCR se visualizaron en un transiluminador UV, y se estimó el peso molecular del producto PCR en comparación con el marcador molecular utilizado (Lee et al., 2012).

Capítulo IV: Resultados

Análisis morfométrico

El proceso de aislamiento y purificación para obtener cultivos puros de *Colletotrichum* de las muestras vegetales recolectadas de distintas provincias de Ecuador dio como resultado 45 cepas morfológicamente heterogéneas. En la tabla 9 se describen las diferencias en la forma y color, de las colonias y micelio de los aislados de *Colletotrichum* clasificados según el hospedero de donde se aisló. Las diferencias macroscópicas de las cepas se exponen en el Apéndice.

Tabla 9

*Análisis morfológico macroscópico cualitativo de los aislados de **Colletotrichum** en las provincias donde fueron recolectadas las muestras.*

Hospedero	Código de laboratorio	Colonia			Micelio	
		Forma	Reverso	Forma	Color	Centro
Aguacate	FP-23-0430	Circular	Gris claro	Crateriforme	Gris claro	Gris claro
	FP-23-0852	Circular	Gris claro	Crateriforme	Gris claro	Gris claro
	FP-23-0853	Circular	Gris claro	Crateriforme	Gris claro	Gris claro
Ají	FP-23-089	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
Apio	FP-23-0851	Circular	Blanco	Crateriforme	Blanco	Blanco
	FP-23-0257	Circular	Marrón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
Cacao	FP-23-0361	Circular	Marrón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0362	Circular	Marrón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0363	Circular	Marrón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0367	Circular	Gris claro	Crateriforme	Gris claro	Gris claro
	FP-23-0368	Circular	Marrón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0645	Circular	Marrón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0646	Circular	Marrón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0643	Circular	Gris claro	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0644	Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro	Gris oscuro
	Café	FP-23-0677	Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro
FP-23-0855		Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro	Gris oscuro
Caña	FP-23-0691	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
	FP-23-0286	Circular	Gris claro	Crateriforme	Gris oscuro	Gris oscuro
Frejol	FP-23-0650	Circular	Gris claro	Crateriforme	Gris oscuro	Gris oscuro
	FP-23-085	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
Guanábana	FP-15-0262	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Blanco

Hospedero	Código de laboratorio	Colonia			Micelio	
		Forma	Reverso	Forma	Color	Centro
Haba	FP-23-0287	Circular	Gris claro	Crateriforme	Gris oscuro	Gris oscuro
	FP-23-0683	Circular	Gris claro	Crateriforme	Gris oscuro	Gris oscuro
Limón	FP-23-0768	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
	FP-23-0769	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
Mandarina	FP-23-085	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
	FP-23-085	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
Maní	FP-23-0415	Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro	Verdoso
	FP-23-0416	Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro	Blanco
Maracuyá	FP-23-0742	Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0743	Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0746	Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
	FP-23-0747	Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro	Salmón
Mora	FP-23-085	Circular	Gris oscuro	Crateriforme	Gris oscuro	Gris oscuro
Naranja	FP-23-0817	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
	FP-23-0818	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
	FP-23-0818	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
Naranjilla	FP-23-0692	Circular	Blanco	Crateriforme	Blanco	Blanco
Pimiento	FP-23-0860	Circular	Salmón	Crateriforme	Blanco	Salmón
	FP-23-0649	Circular	Blanco	Crateriforme	Blanco	Blanco
Tomate de árbol	FP-23-651	Circular	Blanco	Crateriforme	Blanco	Blanco
	FP-23-0665	Circular	Blanco	Crateriforme	Blanco	Blanco
	FP-23-0666	Circular	Blanco	Crateriforme	Blanco	Blanco
Pitahaya	FP-23-0833	Circular	Salmón	Crateriforme	Gris claro	Salmón

Figura 2

Comparación de morfología macroscópica de 2 cepas de *Colletotrichum* aislado de Cacao



Nota. **A** corresponde al aislado de la muestra FP-23-0367 en medio PDA. **B** corresponde al aislado de la muestra FP-23-0368 en medio PDA.

Los conidios de los aislados de *Colletotrichum* fueron hialinos, con forma cilíndrica, de extremos redondeados, rectos y lados paralelos, algunas cepas presentaron conidios con uno o ambos extremos ahusados. La tabla 10 detalla la morfología cualitativa (formas) y cuantitativa (promedio de las medidas de largo y ancho) de los conidios de cada aislado. Las diferencias microscópicas entre los conidios se muestran en el apéndice.

Tabla 10

Morfología microscópica cualitativa de los conidios de cada aislado de *Colletotrichum*

Hospedero	Código de laboratorio	Apariencia		
		Forma	Lado 1	Lado 2
Aguacate	FP-23-0430	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-085	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-085	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Ají	FP-23-08	Cilíndrica	Redondo	Redondo

Hospedero	Código de laboratorio	Apariencia		
		Forma	Lado 1	Lado 2
Apio	FP-23-0851	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
	FP-23-0257	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0361	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0362	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Cacao	FP-23-0363	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0367	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0368	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0645	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0646	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0643	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0644	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
Café	FP-23-0677	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
	FP-23-0855	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
Caña	FP-23-0691	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
Frejol	FP-23-0286	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0650	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Granadilla	FP-23-085	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Guanábana	FP-15-262	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
	FP-23-0287	Cilíndrica	Ahusado	Ahusado
Haba	FP-23-0683	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
	FP-23-0768	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Limón	FP-23-0769	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-085	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Mandarina	FP-23-085	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Maní	FP-23-0415	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0416	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Maracuyá	FP-23-0742	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0743	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0746	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0747	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Mora	FP-23-085	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
Naranja	FP-23-0817	Cilíndrica	Redondo	Redondo

Hospedero	Código de laboratorio	Apariencia		
		Forma	Lado 1	Lado 2
	FP-23-0818	Cilíndrica	Redondo	Redondo
	FP-23-0818	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Naranjilla	FP-23-0692	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
Pimiento	FP-23-0860	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
	FP-23-0649	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
Tomate de árbol	FP-23-651	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
	FP-23-0665	Cilíndrica	Redondo	Ahusado
	FP-23-0666	Cilíndrica	Redondo	Redondo
Pitahaya	FP-23-0833	Cilíndrica	Redondo	Redondo

El largo de los conidios presentó diferencias significativas entre aislados ($F= 56,24$; $p < 0,0001$), esto se describe en la tabla 11, donde se observa que la muestra FP-23-0855 presentó conidios de menor largo y con un valor promedio de $5,67 \pm$ desviación estándar μm , mientras que la muestra FP-23-0362 presentó conidios de mayor largo con un valor promedio de $9,80 \pm$ desviación estándar μm . De igual manera se demostró que el ancho de los conidios presentó diferencias significativas entre aislados ($F= 44,55$; $p < 0,0001$), esto se detalla en la tabla 15, siendo las muestras FP-23-0859 y FP-23-0855 las que presentaron conidios de menor ancho, con una media de $1,67 \pm$ desviación estándar μm y $1,69 \pm$ desviación estándar μm respectivamente. Por otro lado, la muestra FP-23-0768 presentó los conidios más anchos, con una media de $3,58 \pm$ desviación estándar μm .

Tabla 11

Promedio \pm Desviación estándar del largo de los conidios de los aislados

Código de laboratorio	Media \pm Error		
FP-23-0855	$5,67 \pm 0,14$	A	
FP-23-0852	$6,21 \pm 0,14$	A	B

Código de laboratorio	Media ±Error									
FP-23-0853	6,42±0,14	B	C							
FP-23-0851	6,54±0,14	B	C							
FP-23-0257	6,57±0,14	B	C	D						
FP-23-0643	6,68±0,14	B	C	D						
FP-23-0691	6,79±0,14	B	C	D						
FP-23-0287	6,85±0,14	B	C	D						
FP-23-0644	6,86±0,14	B	C	D						
FP-23-0859	6,88±0,14	B	C	D	E					
FP-23-0746	7,05±0,14		C	D	E					
FP-23-0368	7,10±0,14		C	D	E					
FP-23-0367	7,13±0,14		C	D	E					
FP-15-0262	7,28±0,14			D	E	F				
FP-23-0858	7,29±0,14			D	E	F				
FP-23-0854	7,60±0,14				E	F	G			
FP-23-0361	7,92±0,14					F	G	H		
FP-23-0363	8,14±0,14						G	H	I	
FP-23-0677	8,17±0,14						G	H	I	
FP-23-0692	8,19±0,14							H	I	
FP-23-0818	8,35±0,14							H	I	
FP-23-0430	8,57±0,14							H	I	J

Código de laboratorio	Media ±Error		
FP-23-0645	8,73±0,14	I	J

Nota. Medias o valores promedios acompañados con la misma letra son estadísticamente similares (Duncan $\alpha=0,05$).

El largo de los conidios presentó diferencias significativas entre cultivos ($F= 22,93$; $p < 0,0001$), esto se describe en la tabla 11, donde se observa que las muestras aisladas del cultivo de apio presentaron conidios de menor largo y con un valor promedio de $6,54\pm 0,14 \mu\text{m}$, mientras que las muestras aisladas del cultivo de limón presentaron conidios de mayor largo con un valor promedio de $8,96 \pm 0,14 \mu\text{m}$. De igual manera se demostró que el ancho de los conidios presentó diferencias significativas entre cultivos ($F= 47,97$; $p < 0,0001$), esto se detalla en la tabla 12, siendo las muestras aisladas de los cultivos de ají y mandarina las que presentaron conidios de menor ancho, con una media de $1,67\pm 0,14 \mu\text{m}$ y $1,74\pm 0,14 \mu\text{m}$ respectivamente. Por otro lado, las muestras aisladas del cultivo de limón presentaron los conidios más anchos, con una media de $3,29\pm 0,14 \mu\text{m}$.

Tabla 12

Promedio ± Desviación estándar del ancho de los conidios de los aislados

Código de laboratorio	Media ±Error		
FP-23-0859	1,67±0,14	A	
FP-23-0855	1,69±0,14	A	B

Código de laboratorio	Media ±Error					
FP-23-0858	1,74±0,14	A	B	C		
FP-23-0853	1,92±0,14			C	D	
FP-23-0852	2±0,14			C	D	
FP-23-0643	2,03±0,14			C	D	
FP-23-0851	2,04±0,14			C	D	
FP-23-0287	2,06±0,14			D	E	
FP-23-0257	2,15±0,14			D	E	
FP-23-0746	2,19±0,14			D	E	
FP-23-0691	2,21±0,14			E	F	
FP-23-0644	2,35±0,14			F	G	
FP-23-0677	2,41±0,14			F	G	H
FP-23-367	2,47±0,14			F	G	H
FP-23-0854	2,49±0,14			F	G	H

Código de laboratorio	Media ±Error						
FP-23-0645	2,53±0,14	F	G	H			
FP-23-0361	2,56±0,14		G	H			
FP-23-0368	2,61±0,14			H	I		
FP-23-0430	2,68±0,14			H	I	J	
FP-15-0262	2,69±0,14				I	J	K
FP-23-0692	2,84±0,14					J	K
FP-23-0818	2,89±0,14						K
FP-23-0363	2,90±0,14						K
FP-23-0818	2,90±0,14						K
FP-23-0363	3,01±0,14						K
FP-23-0857	3,04±0,14						K
FP-23-0819	3,05±0,14						K

Código de laboratorio	Media ±Error	
FP-23-0768	3,58±0,14	L

Nota. Medias o valores promedios acompañados con la misma letra son estadísticamente similares (Duncan $\alpha=0,05$).

Análisis metabólico

Tras el análisis morfológico, se seleccionaron 6 aislados puros procedentes de 6 cultivos distintos. La primera lectura del perfil metabólico se realizó después de 3 días de incubación de las microplacas FF Microplates (Figura 3). El software identificó tres de los cinco aislados como *Colletotrichum gloeosporioides* con probabilidad de confianza entre 0,997 y 1,00 como se puede observar en la tabla 16. En el apéndice se pueden observar los perfiles metabólicos de las cepas incubadas.

Tabla 13

Resultados de lecturas BIOLOG

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

Figura 3

Ejemplo de microplaca BIOLOG FF microplate



Nota. Patrón metabólico correspondiente a la muestra FP-23-0362

Análisis molecular

Tras la extracción de ADN se evaluó la calidad y cantidad de ADN extraído (tabla 14). Se realizaron diluciones a las muestras que presentaron una concentración más de 30 ng/ μL .

Tabla 14

Concentración de ADN extraído

Código de laboratorio	Ácidos nucleicos (ng/ μL)	260/280	Tipo de muestra
FP-23-257	85,3	1,66	Aislado
FP-23-286	82,6	1,51	Aislado
FP-23-287	297,8	1,93	Aislado

Código de laboratorio	Ácidos nucleicos (ng/ μL)	260/280	Tipo de muestra
FP-23-361	117,3	1,82	Aislado
FP-23-362	1364,3	2,09	Aislado
FP-23-363	920,3	2,05	Aislado
FP-23-367	48,6	1,73	Aislado
FP-23-368	1242,2	1,52	Aislado
FP-23-415	307,1	1,93	Aislado
FP-23-416	156,8	1,71	Aislado
FP-23-430	312,4	1,92	Aislado
FP-23-643	181,5	1,78	Aislado
FP-23-644	136,7	1,65	Aislado
FP-23-645	49,3	1,62	Aislado
FP-23-646	48,5	1,90	Aislado
FP-23-649	158,8	1,57	Aislado
FP-23-650	571,3	1,37	Aislado
FP-23-651	2,6	2,07	Aislado
FP-23-665	181,5	1,78	Aislado
FP-23-666	59,6	1,53	Aislado
FP-23-677	90,0	1,53	Aislado
FP-23-683	85,2	1,66	Aislado
FP-23-691	34,7	1,40	Aislado
FP-23-692	21,7	1,53	Aislado
FP-23-742	295,0	1,85	Aislado
FP-23-743	43,2	1,71	Aislado
FP-23-746	127,4	1,92	Aislado
FP-23-747	40,6	1,74	Aislado
FP-23-768	608,4	1,93	Aislado
FP-23-769	613,3	1,86	Aislado
FP-23-0857	136,7	1,65	Aislado
FP-23-0854	27,5	1,57	Aislado
FP-23-0851	146,6	1,82	Aislado
FP-23-0856	3133,1	1,24	Aislado
FP-23-0858	273	1,94	Aislado

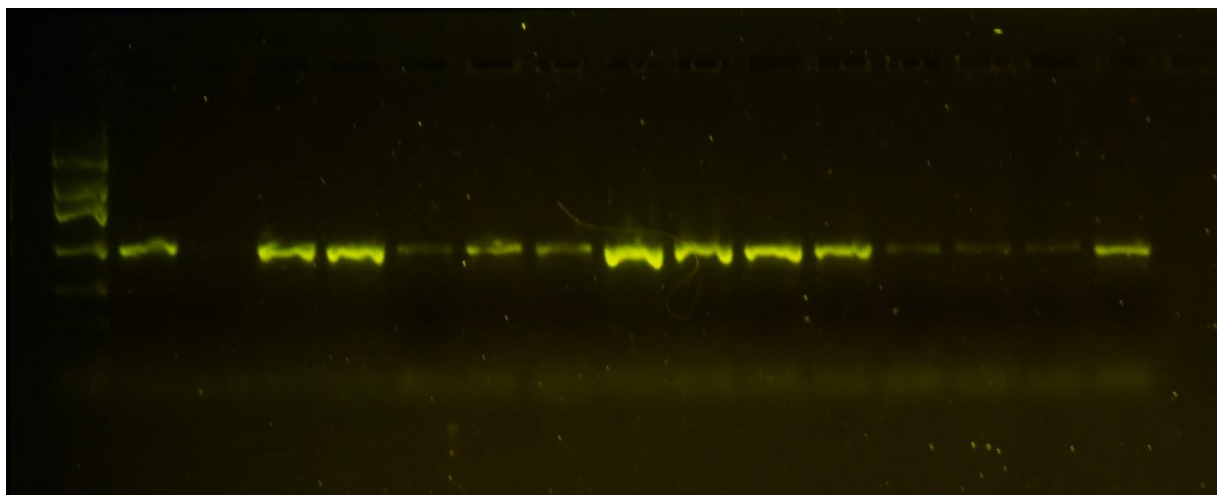
Código de laboratorio	Ácidos nucleicos (ng/ μL)	260/280	Tipo de muestra
FP-23-0859	753,5	1,49	Aislado
FP-23-0860	43,2	1,71	Aislado
FP-23-0852	146,6	1,82	Aislado
FP-23-0853	131,1	1,91	Aislado
FP-23-0855	373,4	1,95	Aislado
FP-23-0857	29,2	1,71	Aislado
FP-23-0833	198,5	1,36	Hoja
FP-23-0817	1799,1	1,14	Hoja
FP-23-0818	1662,5	0,95	Hoja
FP-23-0819	808,7	1,01	Hoja

El análisis molecular se realizó para las 45 muestras obtenidas. La amplificación de ADN se realizó mediante PCR convencional, siguiendo los parámetros descritos anteriormente.

La amplificación con los cebadores MKCgF y MKCgR, específicos para la detección de *Colletotrichum gleosporioides*, arrojó resultados positivos para 33 aislados (figura 4, figura 5 y figura 6), en la tabla 15 se describen los resultados. La amplificación con los cebadores CY1 y CY2, específicos para la detección de *Colletotrichum lindemuthianum*, arrojó resultados negativos para todas las muestras pues no se observaron amplicones en ninguno de los carriles. Al no contarse con control positivo para el ensayo, se utilizaron ambos pares de cebadores para amplificar ADN de un aislado de *Colletotrichum gleosporioides* previamente identificado por secuenciación.

Figura 4

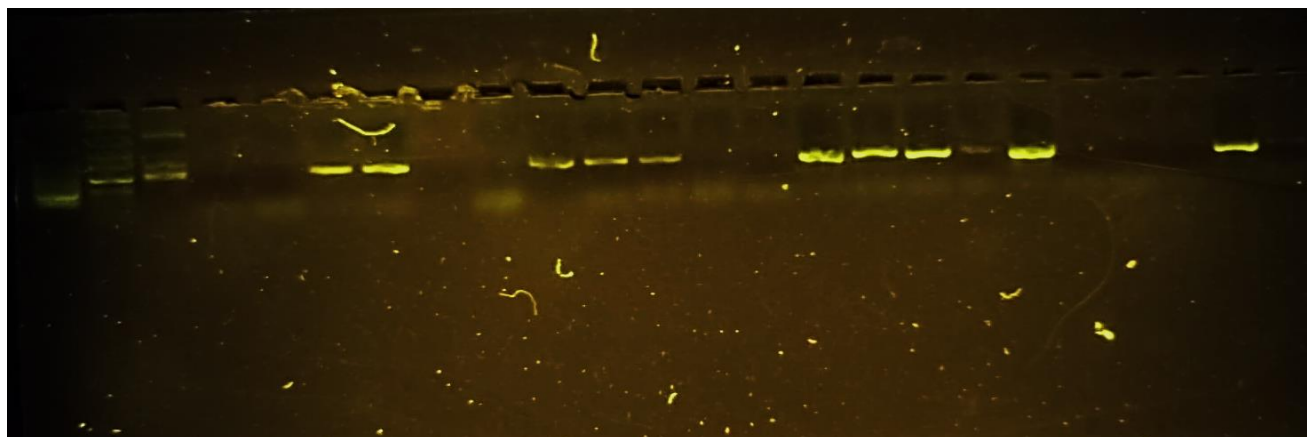
Electroforesis de la amplificación con los cebadores MKCgF y MKCgR



Nota. Carril: 1: Low Mass Lader, 2: control positivo, 3: control negativo, 4: FP-23-0769, 5: FP-23-0287, 6: FP-23-0818, 7: FP-23-0361, 8: FP-23-0855, 9: FP-23-430, 10: FP-23-415, 11: FP-23-0416, 12: FP-23-0817, 13: FP-23-857, 14: FP-23-0854, 15: FP-23-0858, 16: FP-23-0666

Figura 5

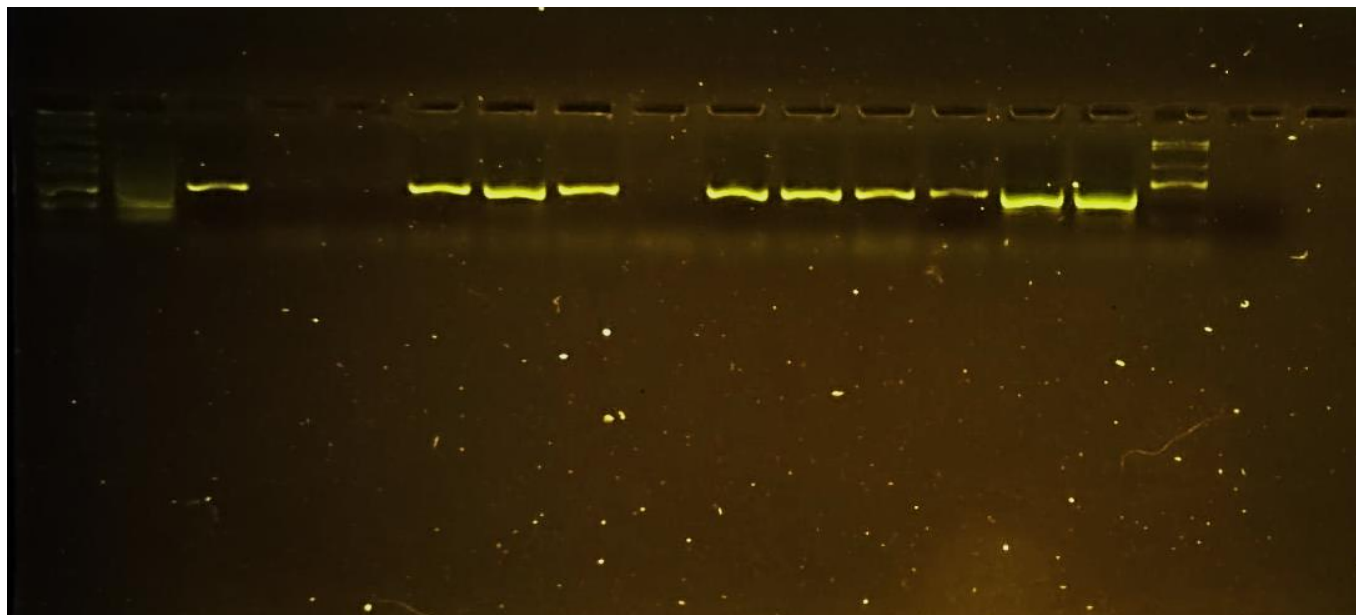
Electroforesis de la amplificación con los cebadores MKCgF y MKCgR



Nota. Carril: 1: Low Mass Lader, 2: control positivo, 3: control positivo, 4: FP-23-644, 5: FP-23-0649, 6: FP-23-0257, 7: FP-23-0286, 8: FP-23-0651, 9: FP-23-0665, 10: FP-23-0650, 11: FP-23-0362, 12: FP-23-0363, 13: FP-23-0683, 14: FP-23-0691, 15: FP-23-0367, 16: FP-23-0368, 17: FP-23-0643, 18: FP-23-0645, 19: FP-23-0346, 20: FP-23-0692, 21: FP-23-0851, 22: FP-23-0856, 23: FP-23-0677, 24: control negativo.

Figura 6

Electroforesis de la amplificación con los cebadores MKCgF y MKCgR



Nota. Carril: 1: Low Mass Lader, 2: Low Mass Lader, 3: control positivo, 4: control negativo, 5: FP-23-0859, 6: FP-23-0742, 7: FP-23-0743, 8: FP-23-0746, 9: FP-23-860, 10: FP-23-0747, 11: FP-23-0768, 12: FP-23-0857, 13: FP-23-852, 14: FP-23-0853, 15: FP-23-0833, 16: FP-23-0819

Tabla 15

Resultados de la electroforesis tras la amplificación con los cebadores MKCgF y MKCgR

Muestra	Resultados
FP-23-257	Positivo
FP-23-286	Positivo

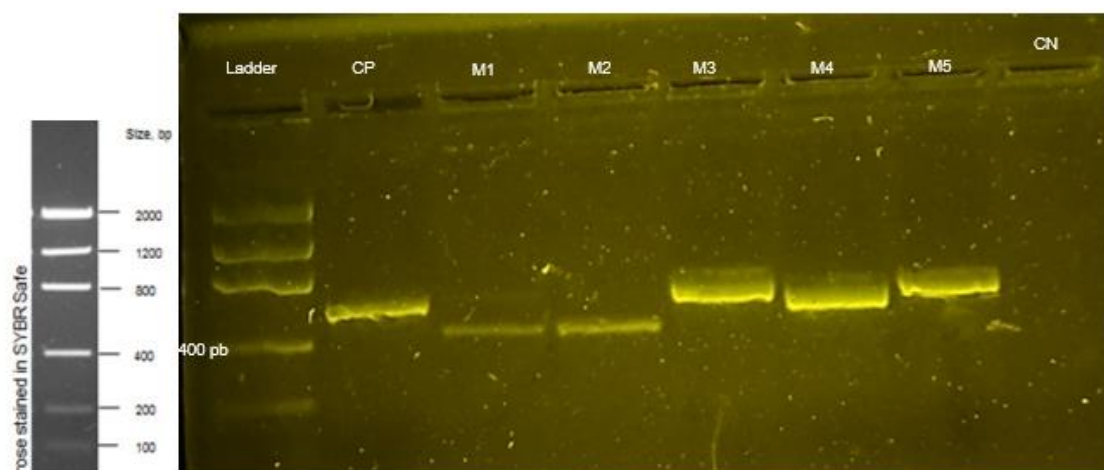
Muestra	Resultados
FP-23-287	Positivo
FP-23-361	Positivo
FP-23-362	Positivo
FP-23-363	Positivo
FP-23-367	Positivo
FP-23-368	Positivo
FP-23-415	Positivo
FP-23-416	Positivo
FP-23-430	Positivo
FP-23-643	Positivo
FP-23-644	Negativo
FP-23-645	Positivo
FP-23-646	Positivo
FP-23-649	Negativo
FP-23-650	Positivo
FP-23-651	Negativo
FP-23-665	Negativo
FP-23-666	Positivo
FP-23-677	Positivo
FP-23-683	Negativo
FP-23-691	Negativo
FP-23-692	Negativo
FP-23-742	Positivo
FP-23-743	Positivo
FP-23-746	Positivo
FP-23-747	Positivo
FP-23-768	Positivo
FP-23-769	Positivo
FP-23-0857	Positivo
FP-23-0854	Negativo
FP-23-0851	Negativo
FP-23-0856	Negativo
FP-23-0858	Positivo

Muestra	Resultados
FP-23-0859	Negativo
FP-23-0860	Negativo
FP-23-0852	Positivo
FP-23-0853	Positivo
FP-23-0855	Positivo
FP-23-0857	Positivo
FP-23-0833	Positivo
FP-23-0817	Positivo
FP-23-0818	Positivo
FP-23-0819	Positivo

La amplificación con los fragmentos universales EF1 y EF2, e ITS1 e ITS4 dio como resultado la amplificación de bandas a la altura de 520 pb con EF1 y EF2 (figura 7), y una banda de amplificación de 570 pb con ITS 1 e ITS4 (figura 8).

Figura 7

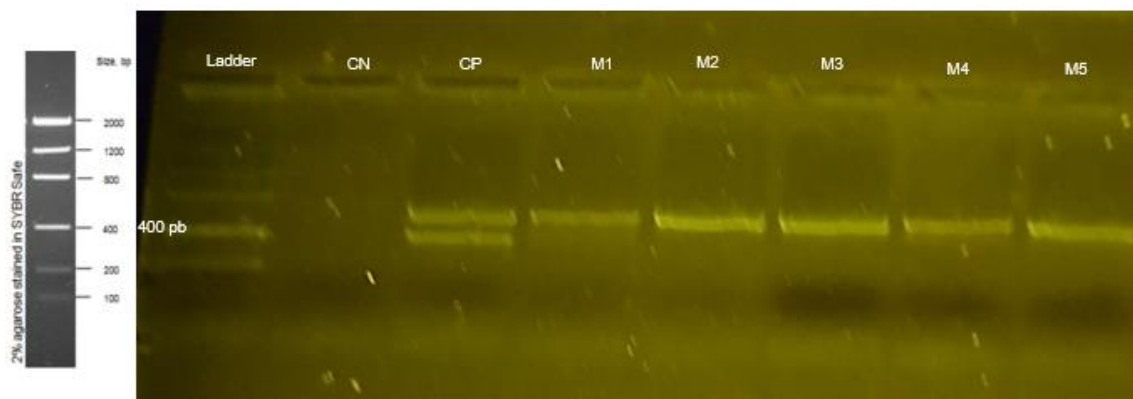
Electroforesis de amplificación de fragmentos con primers EF1 y EF2



Nota. Carril: 1: Low Mass Lader, 2: control positivo, 3: FP-23-0287, 4: FP-23-0651, 5: FP-23-0649, 6: FP-23-0368, 7: FP-23-0818, 8: control negativo

Figura 8

Electroforesis de amplificación de fragmentos con primers ITS 1 e ITS 4



Nota. Carril: 1: Low Mass Lader, 2: control positivo, 3: FP-23-0287, 4: FP-23-0651, 5: FP-23-0649, 6: FP-23-0368, 7: FP-23-0818, 8: control negativo

Capítulo V: Discusión

Después de la purificación de los aislados obtenidos, se observó que todas las colonias fueron de forma circular, crateriformes, algodonosas, de micelio aéreo y márgenes filiformes tal como describe Oliveira et al. (2005) al género *Colletotrichum*. Se pudo observar diferencias morfológicas macroscópicas entre cepas provenientes del mismo tipo de cultivo y también entre cultivos. Las cepas conseguidas de cultivos de cacao se caracterizaron por tener micelio gris claro con un centro color gris claro o salmón y reverso gris claro o marrón, las cepas obtenidas de café presentaron un micelio gris claro, con centro gris oscuro y reverso salmón, las cepas obtenidas de haba y frejol presentaron micelio color gris oscuro uniforme y reverso gris claro, las cepas obtenidas de ají, caña, granadilla, limón, mandarina, naranja, y pimiento presentaron micelio blanco con un centro y reverso color salmón, las cepas obtenidas de tomate de árbol, naranjilla y apio presentaron micelio blanco con reverso blanco, y las cepas obtenidas de guanábana presentaron un micelio blanco con reverso salmón. Las cepas obtenidas de maní

presentaron micelio gris claro, con centro gris verdoso o blanco y reverso salmón. Las cepas obtenidas de pitahaya, maracuyá presentaron micelio gris claro, con centro y reverso salmón. Por último, las cepas obtenidas de mora presentaron micelio gris oscuro uniforme y reverso gris claro. Esta variabilidad de colores en las colonias se certifica con lo descrito por Damm et al. (2012), que expresa que el aspecto de los aislados de *Colletotrichum* puede depender de la forma de almacenamiento de los aislados o la especialización del patógeno en huéspedes. De igual manera, las especies del género *Colletotrichum* presentan una gran variación morfológica, el color de sus colonias color ser blanco, gris pálido, gris verdoso, naranja, crema o marrón, tienen rangos superpuestos de morfología conidial, sus conidios suelen ser transparentes, de forma cilíndrica, fusiforme o aseptada, con un ancho de entre 1,5 a 4 μm y un largo de entre 3 a 20 μm dependiendo de la especie (Adaskaveg y Hartin, 1997).

El largo de los conidios obtenidos de caña, café, haba, y ají no presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre sí, con un largo de entre 6,79 y 6,88 μm . El largo de los conidios de maracuyá, aguacate, guanabana y mandarina, tampoco fueron significativamente diferentes entre sí, con un largo de entre 7,05 μm y 7,29 μm . El largo de las conidias de granadilla fue de 7,60 μm , mientras que el largo de las conidias procedentes de cacao y naranjilla fueron estadísticamente similares entre sí, con un largo de 7,91 y 8,19 respectivamente. Por último, el largo de las conidias provenientes de naranja y limón no fueron estadísticamente diferentes entre sí, presentando un largo de 8,73 μm y 8,96 μm . Respecto al ancho, las conidias de ají y mandarina no fueron significativamente diferentes entre sí, con un ancho de 1,67 μm y 1,74 μm . El ancho de las conidias de apio, haba, café, maracuyá, aguacate y caña fue similar entre ellos, con un rango de entre 2,04 a 2,21 μm . El ancho de las conidias procedentes de granadilla y cacao fueron estadísticamente similares, con un promedio de 2,49 y 2,59 μm respectivamente. Las conidias de Guanábana presentaron un ancho de 2,69 μm . Las conidias de naranjillas y naranja presentaron un ancho estadísticamente similar (2,84 y 2,97 μm respectivamente). Por último, las conidias obtenidas de limón, fueron las más anchas del

análisis ya que presentaron una medida de 3,29 μm . Los conidios de *Colletotrichum* aislados de los distintos cultivos, exhibieron un largo promedio que fue desde 6,94 hasta 8,96 μm y un ancho promedio que fue desde 1,67 a 3,29 μm . Los conidios más pequeños en el análisis fueron aquellos obtenidos de apio ya que presentaron un largo de 6,54 μm . Según Pérez et al. (2003), el tamaño de las conidias de *C. gloeosporioides* varían entre 7 y 8 μm de largo y 2 a 4 μm de ancho. Las medidas de los conidios obtenidos de maracuyá, aguacate, guanabana, granadilla, cacao, naranjilla, naranja y limón, se encuentran dentro de este rango, por lo que podríamos clasificar estas muestras como *C. gloeosporioides*. Por otro lado, autores como Sutton et al. (1992), Abera et al (2016) y Kimaru et al. (2018) describen que los conidios de la especie *C. gloeosporioides* presenta un largo de 8,5 a 16,5 μm y un ancho de 3,5 a 5 μm . Hay que considerar que según Ordynets et al. (2021) el éxito de un análisis morfométrico dependerá en gran medida del número de observaciones por grupo, que en promedio debe ser 30 y el estado de la muestra, considerando que se debe realizar las mediciones de conidios en estado maduro y evitar las esporas inmaduras.

Tras el análisis metabólico después de los 3 primeros días de incubación, 3 de las 6 cepas analizadas arrojaron un resultado positivo. El aislado FP-23-0287, proveniente de haba, FP-23-0415, proveniente de maní, y FP-23-0769, proveniente de limón, fueron identificados como *C. gloeosporioides* por el software de identificación microbiana BIOLOG, sin embargo, los aislados FP-23-0362, FP-23-0643 y FP-23-0651 no fueron identificados. Según el manual de instrucciones BIOLOG Inc (2010), el software no identificará un cultivo si este se encuentra contaminado, el microorganismo no es adecuado para el tipo de microplaca, el cultivo es muy viejo, el líquido de inoculación no se preparó correctamente o si el pocillo A1, correspondiente a agua, no se encuentra lo suficientemente lleno ya que el sistema lo usa como referencia para la lectura; de igual manera el sistema no identificará el aislado si la especie no se encuentra dentro de la base de datos o si la similitud después del cuarto día de lectura es menor a 0,6.

Los 33 aislados que dieron positivos para *C. gloeosporioides* mostraron bandas amplificadas aproximadamente a los 380 bp, estos aislados fueron obtenidos de café, limón, mandarina, tomate de árbol, cacao, pitahaya, haba, frejol, maracuyá, naranja, aguacate, guanabana y maní. Mientras que los 12 aislados que no presentaron banda de amplificación correspondieron a cepas obtenidas de caña, naranjilla, tomate de árbol, granadilla, mora, café, pimiento y apio. 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*, por lo que los 12 aislados que no presentaron banda de amplificación pueden ser otra especie de *Colletotrichum* o pertenecer a otro género. 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, sin embargo, ningún aislado de los analizados amplificó banda para este par de primers, por lo que se descarta la presencia de *C. lindemuthianum*. (Martínez et al., 2014).

Capítulo VI: Conclusiones

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 aísla el patógeno.

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 6,54 μm a 8,96 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.

Capítulo VII: 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.

Aumentar el tiempo de electroforesis a una hora para visualizar bien las bandas en el gel.

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.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Abera, A., Lemessa, F., y Adunga, G. (2016). Morphological characteristics of *Colletotrichum* species associated with mango (*Mangifera indica* L.) in Southwest Ethiopia. *Food Science and Quality Management*, 48(1), 106-115. <https://doi.org/ISSN 2225-0557>
- Adaskaveg, J., y Hartin, R. (1997). Characterization of *Colletotrichum acutatum* Isolates Causing Anthracnose. *Phytopathology*, 87(9), 979-987. <https://doi.org/doi:10.1094/phyto.1997.87.9.979>
- Agrocalidad. (2017). *Resolución 0122*. Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Alegbede, J., y Lateef, A. (2018). Valorization of Corn-Cob by Fungal Isolates for Production of Xylanase in Submerged and Solid State Fermentation Media and Potential Biotechnological Applications. *Waste and Biomass Valorization*, 9(8), 1273-1287. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9932-y>
- Alsohaili, S., y Bani-Hasan, B. (2018). Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 11(3), 329-337. https://doi.org/https://www.researchgate.net/publication/323377785_Morphological_and_Molecular_Identification_of_Fungi_Isolated_from_Different_Environmental_Sources_in_Northern_Eastern_Jordan_Deseret
- Aragaw, G., Chala, A., y Terefe, H. (2023). Cultural and morphological characteristics of *Colletotrichum sublineolum* isolates infecting sorghum in eastern Ethiopia. *Heliyon*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13057>
- Baroncelli, R., Talhinhos, P., Pensec, F., Sukno, S., Le Floch, G., y Thon, M. (2017). The *Colletotrichum acutatum* Species Complex as a Model System to Study Evolution and Host Specialization in Plant Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8(2001), 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02001>

- Beltrán, M., y García, D. (2006). COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES FITOPATÓGENO ASOCIADO A LA NUTRICIÓN HUMANA. *Investigaciones Andinas*, 8(13), 73-80.
- Bhunjun, C., Phukhamsakda, C., Jayawardena, R., Jeewon, R., Promputtha, I., y Hyde, K. (2021). Investigating species boundaries in Colletotrichum. *Fungal Diversity*, 107, 107-127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13225-021-00471-z>
- BIOLOG. (2010). *FF Microplate™ Instructions for Use*. USA: BIOLOG.
- Busby, P. E., Ridout, M., y Newcombe, G. (2016). Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant molecular biology*, 90(6), 645-655. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11103-015-0412-0>
- Cai, L., Hyde, K. D., Paul, T., Weir, B. S., Waller, J., Musumbale, M., . . . Liu, Z. (2009). A polyphasic approach for studying Colletotrichum. *Fungal Diversity*, 39, 183-204.
- Cai, L., Hyde, K., Taylor, P., Weir, B., Waller, J., Abang, M., . . . Johnston, P. (2009). A polyphasic approach for studying Colletotrichum. *Fungal Diversity*, 39, 183-187. <https://doi.org/39:183-20>
- Cannon, P., Damm, U., y Weir, B. (2012). Colletotrichum – current status and future directions. *Studies in mycology*, 73(1), 181-213. <https://doi.org/https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Cano, J., Guarro, J., y Gené, J. (2004). Molecular and Morphological Identification of Colletotrichum Species of Clinical Interest. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jcm.42.6.2450-2454.2004>
- Castellanos, G., Jara, C., y Mosquera, G. (2011). *Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del Frijol*. Centro internacional de Agricultura Tropical. <https://doi.org/https://hdl.handle.net/10568/54435>
- Costa, J., Kamei, S., Silva, J., Miranda, A., Netto, M., da Silva, S., . . . Assunção, I. (2019). Species diversity of Colletotrichum infecting Annona spp. in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 1119–1130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10658-018-01630-w>

- Cristobal, A., Yáñez, M., Solano, R., Obdulia, L., y Hernández, A. (2017). Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, 147, 605–614. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10658-016-1029-0>
- Crouch, A. (2014). *Colletotrichum caudatum* s.l. is a species complex. *IMA Fungus*, 5(1), 17-30. <https://doi.org/https://doi.org/10.5598/imafungus.2014.05.01.03>
- da Silva, L., Alvarado, H., Nunes, H., Ferreira, M., y de Queiroz, M. (2020). *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1891-1904. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-020-10363-y>
- da Silva, L., Alvarado, H., Nunes, H., Ferreira, M., y de Queiroz, M. (2020). *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1891–1904. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-020-10363-y>
- Damm, U., Cannon, P., Liu, F., Barreto, R., Guatimosim, E., y Crous, P. (2013). The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. *Fungal Diversity*, 61, 29-59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13225-013-0255-4>
- Damm, U., Cannon, P., Woudenberg, J., Johnston, P., Weir, B., Tan, Y., . . . Crous, P. (2012). The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*, 73(1), 1-36. <https://doi.org/https://doi.org/10.3114/sim0002>
- Damm, U., O'Connel, R., Groenenwald, J., y Crous, P. (2014). The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. *Studies in Mycology*, 79, 49-84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.003>

- Damm, U., Sato, T., Alizadeh, A., Groenewald, J., y Crous, P. (2019). The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. *Studies in Mycology*, 92(1), 1-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.04.001>
- Damm, U., Woudenberg, J., Cannon, P., y Crous, P. (2009). *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hos. *Fungal Diversity*, 39, 45-87.
- de Aguiar Carraro, T., Moreira, R. R., Gelain, J., y May De Mio, L. L. (2022). Etiology and epidemiology of diseases caused by *Colletotrichum* spp. in persimmon, apple, peach and grapevine. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 28(1), 136-162. <https://doi.org/10.31976/0104-038321v280006>
- De Silva, D., Crous, P., Ades, P., Hyde, K., y Taylor, P. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *British Mycological Society*, 31(3), 155-168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2 de Diciembre de 2019). *La FAO presenta 2020 como Año Internacional de la Sanidad Vegetal*. <https://www.fao.org/news/story/es/item/1253562/icode/>
- Freeman, S., Katan, T., y Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. *Plant Disease*, 82(6), 596. <https://doi.org/1998.82.6.596>
- Freeman, S., y Shabi, E. (1996). Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(6), 395-404. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0062>
- Gan, P., Ikeda, K., Irieda, H., Narusaka, M., O'Connell, R., Narusaka, Y., . . . Shirasu, K. (2013). Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *The New phytologist*, 197(4), 1236-1249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.12085>

- Gautam, A. K. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, Pathogenicity and Management in India. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000125>
- Jayawardena, R., Hyde, K., Bhujun, C., Gentekaki, E., y Itthayakorn, P. (2021). *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. *Mycosphere*, 12(1), 519-669. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/12/1/7>
- Jayawardena, R., Hyde, K., Damm, U., Cai, L., Liu, M., Li, X., . . . Yan, J. (2016). Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere*, 7(8), 1192–1260. <https://doi.org/https://doi.org/10.3897/mycokeys.93.89209>
- Jimenez, W., Ramírez, A., López, J., y Alvarez, A. (2022). Análisis filogenético de aislamientos patogénicos de la familia Botryosphaeriaceae en cacao. *Revista Ciencia y Tecnología OJS*, 15(2), 43-52. <https://doi.org/https://doi.org/10.18779/cyt.v15i2.583>
- Kamle, M., Pandey, B., Kumar, P., y Kumar, M. (2013). A Species-Specific PCR Based Assay for Rapid Detection of Mango. *Plant Pathology & Microbiology*, 4(6), 1-6. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000184>
- Khan, A., y Hsiang, T. (2003). The infection process of *Colletotrichum graminicola* and relative aggressiveness on four turfgrass species. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(7), 433-442. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/w03-059>
- Kimaru, S., Monda, E., Cheruiyot, R., Mbaka, J., y Alakonnya, A. (2018). Morphological and Molecular Identification of the Causal Agent of Anthracnose Disease of Avocado in Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2018(1), 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/4568520>
- Lee, P., Costumbrado, J., Hsu, C., y Kim, Y. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of visualized experiments*, 62. <https://doi.org/https://doi.org/10.3791/3923>

- Leite, B., y Nicholson, R. (1992). Mycosporine-alanine: A self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology*, 16(1), 76-86.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0147-5975\(92\)90043-Q](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0147-5975(92)90043-Q)
- Li, Q., Bu, J., Shu, J., Zhihe, Y., Tang, L., Huang, S., . . . Hsiang, T. (2019). *Colletotrichum* species associated with mango in southern China. *Scientific Reports*, 9(18891).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-019-54809-4>
- Liu, F., Cai, L., Crous, P., y Damm, U. (2014). The *Colletotrichum gigasporum* species complex. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 33(15), 83-97.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3767/003158514X684447>
- Liu, F., Ma, Z., Wou, L., Diao, Y., Damm, U., Song, S., y Cai, L. (2022). Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. *Studies in Mycology*, 101, 1-56. <https://doi.org/https://doi.org/10.3114/sim.2022.101.01>
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., . . . Gong, G. (2016). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Scientific Reports*, 6(1), 1-17.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/srep32761>
- Lonza. (2012). *GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain*. Lonza Rockland, Inc.
https://doi.org/https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/download/product/asset/29014
- Lopes da Silva, L., Alvarado Moreno, H. L., Nunes Correia, H. L., Ferreira Santana, M., y Vieira de Queiroz, M. (2020). *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1891-1904.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-020-10363-y>
- Marley, P., Diourte, M., Neyra, A., y Rattunde, F. (2004). Sorghum Anthracnose. *Journal of Sustainable Agriculture*, 25(1), 44-49. https://doi.org/10.1300/J064v25n01_05

- Martinez, L., Vanegas, K., Salazar, M., Gutiérrez, P., y Marín, M. (2014). Detección por PCR de *Colletotrichum lindemuthianum* en. *Acta Agronómica*, 63(4), 377-387.
<https://doi.org/0120-2812>
- Menat, J., Armstrong-Cho, C., y Banniza, S. (2016). Lack of evidence for sexual reproduction in field populations of *Colletotrichum lentis*. *Fungal Ecology*, 20, 66-74.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.11.001>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2020). *Resumen Ejecutivo de los Diagnósticos Territoriales del Sector Agrario*. Coordinación General de Planificación y Gestión Estratégica.
- Moraga, J., Gomes, W., Cantoral, J., Pinedo, C., Hanson, J., Carbú, M., . . . Collado, I. (2019). The current status on secondary metabolites produced by plant pathogenic *Colletotrichum* species. *Phytochem Rev*, 18, 215-239.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11101-018-9590-0>
- Niu, X., Qi, J., Chen, M., Tao, A., Xu, J., Dai, Z., y Su, J. (2016). *Colletotrichum* species associated with jute (*Corchorus capsularis* L.) anthracnose in southeastern China. *Scientific Reports*, 6(25179), 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/srep25179>
- Ntahimpera, N., Madden, L., y Wilson, L. (1997). Effect of Rain Distribution Alteration on Splash Dispersal of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 87(6), 649-655.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.6.649>
- Observatorio de Complejidad Económica . (25 de 05 de 2023). *Complejidad Económica de Ecuador*. <https://oec.world/es/profile/country/ecu?yearlyTradeFlowSelector=flow1>
- Ordynets, A., Kebler, S., y Langer, E. (2021). Geometric morphometric analysis of spore shapes improves identification of fungi. *Plos one*, 16(8).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250477>
- Pérez Castro, L. M., Saquero, M. J., y Beltrán Herrera, J. D. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en

- ñame *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1), 24-35.
<https://doi.org/0123-3475>
- Pérez, L., Baquero, M., y Beltrán, J. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1), 24-35. <https://doi.org/0123-3475>
- Pinzón, Y. A., Bustamante, S. L., y Buitrago, G. (2023). Differential molecular diagnosis *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* in yam (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 52-60.
https://doi.org/https://www.researchgate.net/publication/317506159_Differential_molecular_diagnosis_Colletotrichum_gloeosporioides_and_Fusarium_oxysporum_in_yam_Dioscorea_sp
- QIAGEN. (2016). *Quick-Start Protocol*.
<https://doi.org/https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit>
- Qiao, M., Li, J., Fang, L.-l., Li, J.-y., y Yu, Z.-f. (2021). Morphology, Phylogeny and Pathogenicity of *Colletotrichum menglaense* sp. nov., Isolated from Air in China. *Pathogens*, 10(10), 1243. <https://doi.org/doi:10.3390/pathogens10101243>
- Rogério, F., Bouffleur, T., Ciampi-Guillardi, M., Sukno, S., Thon, M., Massola júnior, N. S., y Baroncelli, R. (2020). Genome Sequence Resources of *Colletotrichum truncatum*, *C. plurivorum*, *C. musicola*, and *C. sojae*: Four Species Pathogenic to Soybean (*Glycine max*). *Phytopathology*, 110(9), 1497-1499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-20-0102-A>
- Sayers EW, et al. (2019). *GenBank. Nucleic Acids Res.* 2019. 47(D1):D94-D99. PubMed.
- Schoch CL, et al. (2020). *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford).* 2020: baaa062. PubMed. Database (Oxford).

- Smith, J., y Moss, M. (1985). *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*. Wiley;.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.3620260514>
- Stukenbrock, E., y Gurr, S. (2023). Address the growing urgency of fungal disease in crops. *Nature*, 617(7959), 31-34. <https://doi.org/> <https://doi.org/10.1038/d41586-023-01465-4>
- Sutton, B. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En J. Bailey, y M. Jeger, *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control (Cabi)* (Vol. 78, pp. 11-26). CABI International. <https://doi.org/0851987567>
- Sutton, B. (1992). The Genus *Glomerella* and Its Anamorph *Colletotrichum*. En J. Bailey, y M. Jeger, *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (pp. 1-26). CAB International.
- Sutton, B. (1992). *The genus Glomerella and its anamorph Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (Vol. 11). CABI International. <https://doi.org/0851987567>
- Talhinhas, P., y Baroncelli, R. (2021). *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity*, 110(12), 109-198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13225-021-00491-9>
- Tang, C., Xu, Q., Zhao, M., Wang, X., y Kang, Z. (2018). Understanding the lifestyles and pathogenicity mechanisms of obligate biotrophic fungi in wheat: The emerging genomics era. *The Crop Journal*, 6(1), 60-67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.11.003>
- Tao, G., Liu, Z.-Y., Liu, F., Gao, Y.-H., y Cai, L. (2013). Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new speices. *Fungal Diversity*, 61, 139-164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13225-013-0254-5>
- Thermo Scientific. (2010). *Nucleic Acid Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers*. <https://doi.org/https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FCAD%2Fmanuals%2Fts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf>

- Wei, L., Zheng, H., Zhang, P., Chen, W., Zheng, J., Chen, C., y Cao, A. (2021). Molecular and biochemical characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates resistant to azoxystrobin from grape in China. *Plant Pathology*, 70(6), 1300-1309.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppa.13372>
- Weir, B., Johnston, P., y Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73(3), 115-180.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3114/sim0011>
- Wet, M., y Brink, H. (2021). Fungi in the bioremediation of toxic effluents. En V. Sharma, M. Shah, S. Parmar, y A. Kumar, *Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology* (pp. 407-431). Academic Press.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. En M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, y T. White, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). Academic Press.
- Wiley, J. (1991). Resolution and recovery of DNA fragments. En J. Wiley, *Current Protocols in Immunology*, (p. Supplement 2). Universidad de California.
- Zakaria, L., Sahak, S., Zakaria, M., y Salleh, B. (2009). Characterisation of *Colletotrichum* Species Associated with Anthracnose of Banana. *Tropical Life Science Research*, 20(2), 119-125. <https://doi.org/PMC3819051>
- Zepeda, A., Arias, C., Flores, F., y Vaca, L. (2013). Laboratory Methods in Cell Biology. En M. Conn, *Methods in Cell Biology* (pp. 361-389). Academic Press.