

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp.
ASOCIADAS A LA ANTRACNOSIS DE *Lupinus mutabilis* (CHOCHO) y *Solanum
betacea* (TOMATE DE ÁRBOL) EN TRES PROVINCIAS DEL ECUADOR.**

Ana Alarcón, César Falconí, Abraham Oleas

Laboratorio de Control Biológico- IASA

RESUMEN

La antracnosis en el Ecuador ha causado varias pérdidas económicas especialmente a nivel post cosecha, éste trabajo tiene como objetivo la caracterización morfológica, patológica y molecular de *Colletotrichum* spp. aislado de *L. mutabilis* y *S. betaceum* en tres provincias del Ecuador. La caracterización macroscópica cualitativa mostró características propias de éste género en el color de las colonias. En cuanto a características cuantitativas las colonias presentaron una tasa de crecimiento promedio que varía entre 18,08 hasta 21,47%. Microscópicamente las conidias presentaron formas elípticas u ovoides, ahusadas y oblongas. El área de las conidias se encontró en un promedio de 12,20 y 12,85 μm^2 . La prueba de sensibilidad a benomyl mostró que el 73,34% de los aislamientos de tomate de árbol son parcialmente resistentes por lo que la probabilidad que la especie de *Colletotrichum* sea *acutatum* fue mayor, el 26,66% restante mostró susceptibilidad sugiriendo ser *C. gloeosporoides*. Esta información fue corroborada con el análisis filogenético que indica que ambas especies de *Colletotrichum* se encuentran genéticamente relacionadas. Las secuencias ITS1 de los productos PCR se relacionan directamente con *C. acutatum*, y comparten genes con *C. gloeosporoides* lo que indica que provienen de una misma línea de evolución. En la prueba de rango de hospederos los aislamientos de *Colletotrichum* provenientes de *S. betaceum* resultaron ser los más virulentos causando muerte a los cultivos probados en el invernadero y los cultivos de *S. betaceum* fueron los más susceptibles a la enfermedad.

Palabras clave.- Antracnosis, *Colletotrichum* spp. , *L. mutabilis*, *S. betaceum*

ABSTRACT

In Ecuador the anthracnose is a disease that causes economical losses especially in the post harvest level. In the present work aims the morphological, pathological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp., isolated from *L. mutabilis* and *S. betaceum* of three Ecuadorian provinces. The macroscopic qualitatively characterization found characteristics own of this gender, the color of the colonies varied from orange with a mixture of gray and green and other shades that come up to salmon color. The quantitative characteristics, the colonies showed average growth rate ranging from 18.08% to 21.47%. Microscopically the spores showed an elliptic shapes tapered and oblongs. The area of the spores encountered in an average of 12.20 μm^2 and 12.85 μm^2 . The benomyl sensitivity test showed that 73.34%

of the tomato tree isolates are partially resistant so the probability that the species *acutatum* of *Colletotrichum* it was higher the remaining 26.66% showed susceptibility suggesting be *C. gloeosporoides*. This information was corroborated by phylogenetic analysis indicating that both *Colletotrichum* species are genetically related. ITS1 sequences of the PCR products are directly related to *C. acutatum*, and they share genes with *C. gloeosporoides* indicating that stem from the same line of evolution. In testing the host range of *Colletotrichum* isolates from *S. betaceum* were the most virulent causing death to crops tested in the greenhouse and crops *S. betaceum* were the most susceptible to the disease.

Key words.- anthracnose, *Colletotrichum* spp. , *L. mutabilis*, *S. betaceum*

INTRODUCCIÓN

El chocho también conocido como lupino o tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) se origina de la zona andina de Sudamérica. Un estudio realizado por FAO (1986) mostró que el chocho en Perú, Bolivia, Ecuador y Chile constituía en un rubro prioritario, mientras que en Argentina y Colombia mostró un rubro de prioridad media. Debido a su alta calidad nutritiva y por ser una fuente valiosa de proteínas (41 a 51%), y de grasa (14-24%), el chocho ha despertado interés también en Europa (Gross *et al.*, 1988). Por lo que se podría decir que esta especie tiene un gran potencial para alimentación humana.

El tomate de árbol (*Solanum betacea*), (*Solanum betaceum*) (*Cyphomandra betacea* Cav. (Sendt)), es originario de la vertiente oriental Andina Sudamericana especialmente de Ecuador, Perú, y Colombia (Zambrano, 2006). Contiene 1,9 % de proteína cruda, 0,1 % de grasa cruda y contiene 14,1 % de carbohidratos y 4,5% de fibra. Debido a este contenido esta especie podría ser utilizado en alimentos nutraceuticos ricos en fibra (Repo y Encina, 2008). Por esta razón esta especie es importante en el consumo humano.

La antracnosis es una enfermedad de difícil control, causa efectos devastadores en la producción de varios cultivos especialmente en chocho y tomate de árbol. El método utilizado generalmente para controlar la antracnosis es mediante la aplicación constante de fungicidas sintéticos, pero esto ha causado riesgos para la salud humana, perjudica al ambiente y además provoca cambios metabólicos en la planta con disminución de la resistencia a enfermedades y plagas, siendo así un método ineficaz y costoso.

El patógeno causante de la antracnosis conocido como *Colletotrichum* spp. tiene gran variabilidad morfológica, e inestabilidad en pruebas bioquímicas (Rodríguez, 2007). El sólo uso de estas pruebas no da resultados confiables. Debido a éstas razones en la actualidad se aplican técnicas moleculares para estudiar el genoma de dicho patógeno y así identificar especies de manera confiable (Rodríguez, 2007).

La caracterización genética de las especies del género *Colletotrichum* que se asocian a la antracnosis de cultivos de chocho y tomate de árbol contribuirá con estudios para el mejoramiento genético en la búsqueda de variedades resistentes.

Mediante métodos modernos la Fitopatología logra un correcto diagnóstico de enfermedades relacionadas con *Colletotrichum*, esto permite desarrollar alternativas de manejo apropiado de la enfermedad (Rodríguez, 2007).

METODOLOGÍA

Área de estudio.- Se localizó varias plantaciones de chocho y de tomate de árbol en las provincias de Cotopaxi, Imbabura y Pichincha (Sierra Ecuatoriana). Se realizó el muestreo escogiendo plantas con signos de antracnosis, y fueron inmediatamente trasladadas al laboratorio de Control Biológico (IASA).

Realización de cámara húmeda para hongos: Las muestras se desinfectaron con agua y jabón líquido, se colocaron en recipientes que contenían algodón húmedo y se sellaron. Se dejó en reposo por cuatro días.

Aislamiento de *Colletotrichum* spp. : Las muestras que se encontraban en cámara húmeda fueron inoculadas en cajas petri que contenían PDA (Papa Dextrosa Agar) con una dosis de Cloranfenicol (antibiótico), se incubó por 5 días a 26°C.

Obtención de Cultivos monospóricos: Se realizó una suspensión de esporas con las producidas por los aislamientos incubados, se utilizó la técnica de transferencia de gota con la finalidad de que la suspensión esporas se disuelva y se inoculó en cajas petri que contenían PDA con una dosis de Cloranfenicol, se observó en el estereomicroscopio y se localizaron esporas individuales, las mismas que se recogieron y se inocularon nuevamente en cajas petri que contenían PDA y Cloranfenicol. Se incubó por 5 días a 26°C.

Caracterización morfológica de *Colletotrichum* spp. : Se realizó una suspensión de esporas con las que fueron producidas por los cultivos monospóricos incubados, y se colocó 15µl de la suspensión en el centro de una caja petri con PDA y Cloranfenicol. Se incubó por 5 días a 26°C. Después de este período de tiempo se procedió a realizar la caracterización morfológica cualitativa, en donde se observó la forma y color de la colonia, presencia o ausencia de halo concéntrico, forma, aspecto y color del micelio. Para caracterización cuantitativa se midió el diámetro de cada aislamiento. En cuanto a la caracterización morfológica microscópica se observó la forma y color de las conidias, mientras que con el óptico micrométrico se midió el ancho y largo de las conidias.

Prueba de sensibilidad a Benomyl: Se realizó una suspensión de esporas de los cultivos monospóricos se inocularon en cajas petri con PDA, Cloranfenicol mezclado con una dosis de Benomyl (500mg/l) y también se inoculó en cajas petri con PDA y cloranfenicol siendo éstos los aislamientos testigos. Se incubó por 5 días a 26°C. Después de este período de tiempo se procedió a medir los diámetros y se comparó con los diámetros de cada testigo.

Caracterización molecular de *Colletotrichum spp.* : Se realizó la respectiva extracción de ADN con el kit de extracción (E.Z.N.A. Fungal DNA Kit) siguiendo paso a paso el protocolo del kit. Para realizar la cuantificación se utilizó el fluorómetro Qubit (invitrogen) y también se realizó electroforesis y se visualizó a través del transiluminador para comparar los datos y corroborar la concentración de ADN por μl .

Amplificación de ADN de *Colletotrichum spp.* : Se prepararon las soluciones para PCR de acuerdo al número de muestras, de tal manera de llegar a dispensar en los microtubos para PCR $\approx 50 \mu\text{l}$ de la solución madre, y después se añadió la cantidad de ADN al final se añadió la enzima taq polimerasa en cada tubo. Después de haber homogenizado, se llevaron las muestras al termociclador Techne TC-3000 programado para hacer 40 ciclos, distribuidos de la siguiente manera: 1 ciclo de 2 min a 95°C , 30 ciclos de 30s a 95°C (desnaturalización), 1min a 44° (alineamiento) y 1 min a 72° (extensión), terminando con 1 ciclo de 5 min a 72°C y con una temperatura final de enfriamiento de 4°C (CIMMYT, 2006). Los productos PCR obtenidos fueron visualizados en el transiluminador UV, después de haber realizado la electroforesis para realizar la cuantificación respectiva. Las muestras fueron secuenciadas por MACROGEN USA, resultados que fueron enviados vía e-mail. Las secuencias identificadas se compararon con la base de datos del GenBank en el NBCI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) utilizando la interfaz web BLAST. Las secuencias que presentaron similitudes se analizaron filogenéticamente en el software MEGA5.0.

Determinación de rango de hospederos: Se cultivaron en el invernadero plantas de chocho y tomate de árbol, a las mismas que se les inoculó el patógeno en una concentración de 10^5 UFC. Pasadas las dos semanas de la inoculación se evaluó la severidad de las lesiones ocasionadas por el patógeno inoculado de acuerdo a la tabla 1.1 y se realizó un Diseño completamente al zar con sub muestras. Los datos fueron analizados mediante ANOVA con una prueba de Duncan al 5% para comparación de incidencia y separación de medias.

Tabla 1.- Escala para la evaluación de la severidad de infección

ESCALA	LESIONES
1	Sin lesiones
2	Lesiones menores a 2mm
3	Esporulación en tallo y zona apical
4	Lesiones medianas de 2 a 5 mm
5	Lesiones mayores a 5mm
6	Muerte

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica macroscópica.- Después de haber aislado y cultivado monospóricamente *Colletotrichum* spp. de *Lupinus mutabilis* (chocho) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol) se encontró que no existe diferencia significativa. El crecimiento fue radial en el 93,3% de las muestras colectadas de chocho y 86,6% de las muestras colectadas en tomate de árbol. El aspecto algodonoso del micelio fue dominante para toda la población; sin embargo, se encontraron algunas variantes en cuanto al pronunciamiento del anillo en el medio inoculado. Según Freeman *et al.*, (1998) dichas características no son discriminantes para distinguir la especie del patógeno, solo fue válido para una caracterización preliminar.

El color de las colonias se presentó en forma similar para todos los aislamientos. En *Colletotrichum* aislado de *L. mutabilis* las colonias fueron blanco y gris en el haz, y verde con gris en el envés; siendo éste el color característico de este patógeno aislado de *L. mutabilis* como describe Rosas (2009). El patógeno aislado de *S. betaceum* presentó un color anaranjado con gris en el haz, y salmón combinado con gris y verde en el envés; tal como lo describen Contreras (2006), Rosas (2009). Según Simmonds (1965), éstos colores describen al género *Colletotrichum* spp. para *C. acutatum* sin tomar en cuenta el hospedero del que proviene el aislamiento.

Como lo sugieren Freeman *et al.*, (1998), Adaskaveg y Hartin (1997), los cambios de temperatura y medio a los que se han expuesto los aislamientos podrían alterar la morfología del patógeno provocando alteraciones en la descripción morfológica de *Colletotrichum* spp. por lo que es necesario confirmar la especie del patógeno mediante estudios moleculares.

En el patógeno aislado de *L. mutabilis* se observó que en menos de 5 días de incubación, después de haber sido inoculados los aislamientos; la superficie de la caja petri estaba cubierta en un área promedio del 21,4% del área total de la caja. El patógeno de *S. betaceum* alcanzó un área promedio de 18 % del total de la caja. Contreras (2006) reporta una tasa de crecimiento del mismo patógeno de 8-9 mm por día.

Caracterización morfológica microscópica.- Según Rodríguez (2007) la descripción microscópica de las conidias de *Colletotrichum* spp. aisladas en café coincide con las características morfológicas del patógeno aislado de *L. mutabilis* y *S. betaceum*, siendo éstas cilíndricas, nucleadas, alargadas y con extremos puntiagudos o curvos. Aparte de éstas características microscópicas, Ulloa y Hanlin (2001) encontraron conidias de formas elipsoides, ligeramente fusiformes, ovoides, oblongas y elipsoides ligeramente constrictas.

Las conidias de *Colletotrichum* spp. aisladas de *L. mutabilis* resultaron tener un área promedio de 12,8 μm^2 . En aislamientos de *Solanum betaceum* el área promedio resultó ser

de 12,2 μm^2 . No se muestra una diferencia significativa entre ambos promedios respecto al tamaño de las conidias; sin embargo Sutton (1992) encontró conidias que varían entre 8,5 y 16,5 μm de largo y 2,5 μm de ancho. En el presente trabajo el largo de las conidias varió entre 2 a 3 μm , mientras que el ancho osciló entre 1 y 1,3 μm . De acuerdo a lo que propone Contreras (2006), estos tamaños podrían indicar que efectivamente se trata de *C. gloeosporoides* o *C. acutatum*. Según Freeman, Katan y Shabi (1998) y Bailey y Jeger (1992), la morfología de las conidias, así como su tamaño no son elementos satisfactorios para distinguir las especies de *Colletotrichum*.

Prueba de sensibilidad a Benomyl: Según Contreras (2006) la dosis de benomyl que inhibió el crecimiento de las cepas y permitió identificar a *C. gloeosporoides* y *C. acutatum* fue de 0,5 a 1,5 g/l. Freeman *et al.*, (1998) y Bernstein *et al.*, (1995) aseguran que los patógenos sensibles a benomyl se podrían considerar como *C. gloeosporoides*, mientras que aquellos que no mostraron sensibilidad serían *C. acutatum*. Todos los aislamientos de *L. mutabilis* fueron considerados como *C. acutatum* ya que mostraron un crecimiento del 5% al 12% comparado con el crecimiento del patógeno testigo, indicando cierto nivel de resistencia al agroquímico. Algunos aislamientos obtenidos de *S. betaceum* mostraron resistencia con una tasa de crecimiento del 11% al 60% por lo que fueron considerados como *C. acutatum*, el resto de aislamientos no mostraron crecimiento siendo muy sensibles al benomyl por lo que se les clasificó como *C. gloeosporoides*.

Lo que podríamos decir que cuando el agente causal es *C. gloeosporoides*, este fungicida es efectivo mientras que si se trata de *C. acutatum* se tendría que buscar otra alternativa para controlar la enfermedad debido a la agresividad del patógeno (Contreras, 2006).

Caracterización molecular de *Colletotrichum* spp. : Las herramientas moleculares son los métodos más adecuados para establecer diferencias de especies dentro del género en estudio. Las secuencias del marcador ITS1 presentaron mayor confiabilidad en la topología del dendrograma, a diferencia de las secuencias del marcador ITS4 (Falconí César, comunicación personal 2012).

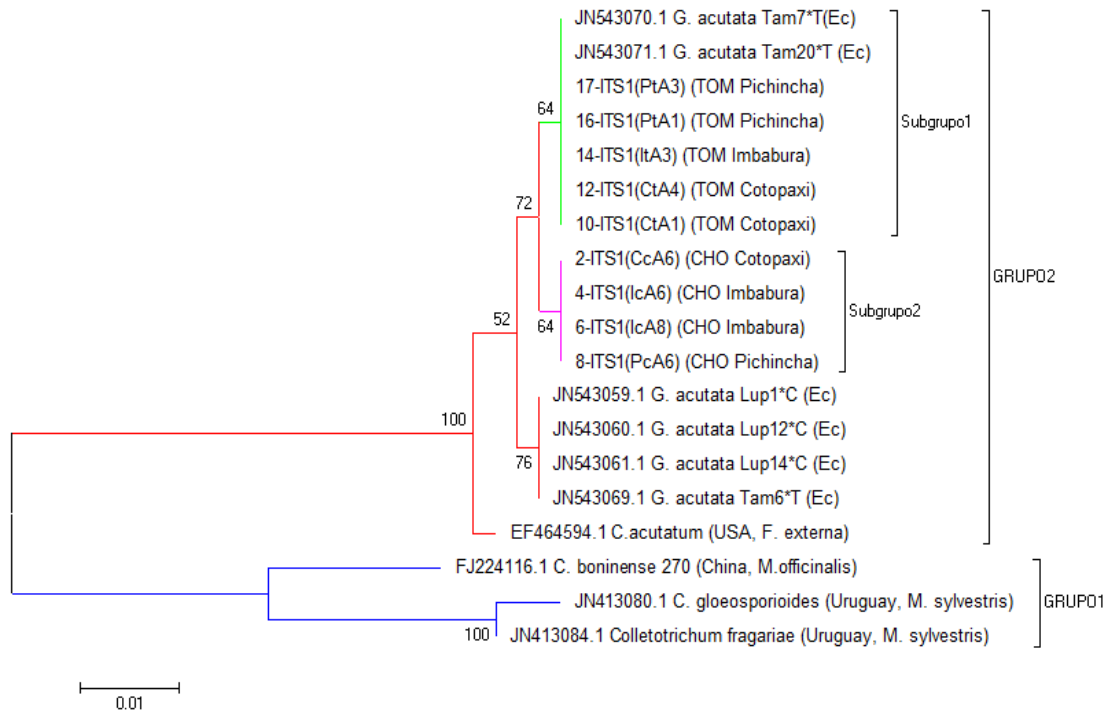


Figura 1. Dendrograma de secuencias ITS1 pertenecientes a especies del género *Colletotrichum*

Análisis del dendrograma: Según Vinuesa (2009), las muestras secuenciadas de ITS1 que presentan una identidad del 70 al 100% son consideradas homologas, como se evidencia en el análisis del dendrograma de la **figura 1**, donde se muestra homología entre las secuencias de todos los productos PCR del ITS1. En el dendrograma se muestra que los grupos 1 y 2 son parálogos entre sí. De igual manera se presentó una paralogía entre subgrupos lo que indica que se trata de genes de la misma especie o de especies distintas que han surgido de un proceso de duplicación (Abascal, 2003).

En el Grupo1 *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* formaron una ortología; es decir que comparten genes que provienen de un mismo gen en el último ancestro común, por lo que se deduce que estas secuencias provienen de *C. acutatum* o de *C. gloeosporioides*.

En el subgrupo 1 los aislamientos de tomate de árbol compartieron genes con secuencias del Genbank (JN543070 y JN543071) colectadas en la zona andina ecuatoriana (Falconí, 2012). Las muestras aisladas de chocho que se encuentran en el subgrupo 2 presentaron alta homología entre ellas y una alta tasa de similitud. Las secuencias que presentaron más variabilidad genética fueron ItA3, PtA1 y PtA3 aisladas de tomate de árbol de las provincias de Imbabura y Pichincha, siendo estas las muestras más destacadas por presentar

mayor divergencia, sin embargo esto no representa una gran diferencia en su tiempo de evolución (Vinuesa, 2009).

Determinación de rango de hospederos: La prueba de patogenicidad de *L. mutabilis* infectado con *C. acutatum* aislado de *L. mutabilis* no mostró diferencia significativa entre los aislamientos PcA5, IcA4 y CcA2, por lo que en este caso no se manifestó variabilidad y la influencia del ambiente en la virulencia como afirma Contreras (2006).

La prueba de patogenicidad de *L. mutabilis* infectado con *C. acutatum* aislado de *S. betaceum* mostró diferencia significativa entre los aislamientos PtA3, CtA7, ItA1, siendo la cepa PtA3 la más virulenta. Luego de la comparación con la prueba de resistencia a benomyl, esta cepa resultó muy resistente y bastante agresiva en concordancia con lo mencionado por Contreras (2006).

La prueba de patogenicidad de *S. betaceum* infectado con *C. acutatum* aislado de *L. mutabilis* mostró una diferencia significativa entre los aislamientos PcA5, IcA4 y CCA2, siendo la cepa PcA5 la más virulenta. En comparación con la prueba de resistencia a benomyl, esta cepa resultó muy resistente y bastante agresiva en concordancia con lo descrito por Contreras (2006). *S. betaceum* resultó ser muy susceptible al patógeno.

La prueba de patogenicidad de *S. betaceum* infectado con *C. acutatum* aislado de *S. betaceum* presentó diferencia significativa entre los aislamientos PtA3, CtA7, ItA1, siendo la cepa ItA1 la más virulenta. Comparando con la prueba de resistencia a benomyl, esta cepa fue muy resistente y agresiva de acuerdo a Contreras (2006). Por presentar resistencia al agroquímico fue considerada como *C. acutatum*.

CONCLUSIONES

La especie *Colletotrichum acutatum* colectada en las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura, causante de la antracnosis en *L. mutabilis* (chocho) incubada a 26°C por 5 días presentó un crecimiento promedio de 21,4%, de forma radial, formado por una circunferencia casi perfecta, con colores blanco grisáceo y verde grisáceo para la colonia, blanco crema con gris para el micelio con anillo pronunciado en el 60% de la población y micelio algodonoso.

La especie *C. acutatum* colectada en las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura, causante de la antracnosis en *S. betaceum* (tomate de árbol) incubada a 26°C por 5 días presentó un crecimiento promedio de 18 %, de forma radial, formado por una circunferencia casi perfecta, con colores anaranjado grisáceo y verde con salmón para la colonia, blanco crema con gris para el micelio con anillo pronunciado en el 33,3% de la población y micelio algodonoso.

La especie *C. acutatum* colectada en las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura, causante de la antracnosis en *L. mutabilis* (chocho) incubada a 26°C por 5 días presentó conidias de forma ovoide, de aspecto ahusado por un lado y redondo por el otro con un tamaño promedio de 12,8 μm^2 .

La especie *C. acutatum* colectada en las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura, causante de la antracnosis en *Solanum betaceum* (tomate de árbol) incubada a 26°C por 5 días presentó conidias de forma ovoide, de aspecto ahusado por un lado y redondo por el otro con un tamaño promedio de 12,2 μm^2 .

El agente causal de la antracnosis en *L. mutabilis* (chocho) y *S. betaceum* (tomate de árbol) es *Colletotrichum acutatum*.

El agroquímico benomyl a una dosis de 500mg/l fue inhibidor de crecimiento para el 53,3% de los aislamientos del patógeno de chocho y para el 26,6% de los aislamientos del patógeno de tomate de árbol.

Molecularmente las secuencias ITS1 de *C. acutatum* aisladas de chocho y tomate de árbol alcanzaron un promedio 596 nucleótidos. Se encontraron 478 sitios conservados y 96 sitios variables de los cuales 54 fueron parsimoniosos informativos que muestran la mayor variabilidad dentro de las secuencias comparadas.

Las secuencias ITS1 mostraron homología en un 100% con la secuencia del Genbank EF464594 que corresponde *Colletotrichum acutatum*.

Las secuencias ITS1 de *C. acutatum* aislado de tomate de árbol mostraron homología con las secuencias del Genbank (JN543070, JN543071), secuencias que corresponden a *G. acutata* aisladas de tomate de árbol, las mismas que también se recolectaron de la zona andina Ecuatoriana (Falconí, 2012).

Las secuencias ITS1 de *C. acutatum* aislado de chocho mostraron homología con las secuencias del Genbank (JN543059, JN543060, JN543061, y JN543069), secuencias que corresponden *G. acutata* aisladas de chocho, las mismas que también se recolectaron de la zona andina Ecuatoriana (Falconí, 2012).

Patológicamente la cepa PtA3 (Pichincha) presentó mayor virulencia al inocularse en plantas de chocho, la cepa PcA5 (Pichincha) fue la más virulenta después de inocularse en plantas de tomate de árbol y la cepa ItA1 (Imbabura) fue la más virulenta al probarse en plantas de tomate de árbol.

Las plantas de tomate de árbol resultaron ser más susceptibles al patógeno *C. acutatum* aislado de *L. mutabilis* y *S. betaceum*, debido a que presentaron un alto índice de mortalidad en comparación a las plantas de chocho.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud a quienes participan en el Laboratorio de Control Biológico del IASA, quienes me dieron la oportunidad de trabajar en el desarrollo del presente trabajo. A la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias por permitir el uso de las instalaciones y equipos, a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por la aprobación del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

Abascal, F. 2003. Análisis de genomas. Métodos para la predicción y anotación de la función de las proteínas. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias Departamento de Biología Molecular. España.

Adaskaveg, J. and Hartin, R. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. En: *Phytopathology*. 87: 979-987.

Bailey, J. y Jeger, M . 1992 *Colletotrichum* biology , Pathology and control. Red Wood Press London, England p 388.

Bernstein, B., Zehr, E. I., Dean, R. A., y Shabi, E. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Dis.* 79:478-482.

CIMMYT, 2006. Protocolos de laboratorio, Laboratorio de genética molecular aplicada. Tercera Edición., Mexico.

Contreras, C. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp., obtenidos de frutos de Lulo (*Solanum quitoense*) ,Tomate de árbol (*Solanum Betacea*) , granadilla (*Passiflora ligularis*), Mango(*Mangifera indica*) y tallos de Mora (*Rubus glaucus*) con síntomas de antracnosis. Bogotá Colombia.

Falconí, C. 1998. Fitopatología Práctica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela Politécnica del Ejército. Primera Edición. Sangolquí, Ecuador.

Falconí, C. 2012. *Lupinus mutabilis* in Ecuador with special emphasis on anthracnose resitance. Ph.D. Thesis, Wageningen University, 146 p.

FAO. 1986. Informe final – Reunión sobre cultivos andinos subexplotados de valor nutricional., pág.27.

Freeman, S., Katan, T. y Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. En: *Plant Disease*. 82(6): 596-604.

Gross, R. 1982. Fitomejoramiento in: El cultivo y la utilización del tarwi *Lupinus mutabilis* Sweet. Estudio FAO: Producción y protección vegetal. pp 90, 91.

Orberá, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Revista Iberoamericana de Micología. 21:15-19. On line. <<http://www.reviberoammicol.com/2004-21/015019.pdf>> (22 Sept. 2011).

Repo, R y Encina, C. 2008. (En línea) Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. Consultado el 17 de septiembre del 2010, disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v74n2/a04v74n2.pdf>

Rodrigues, S. 2006. Estudios Hispatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro(*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. Em plantas obtidas por cultura de embrião. Tesis de Maestría en Agronomía com Ênfasis em fitopatologia. Universidades Federal de lavras. Lavras Brasil.

Rodríguez, A. 2007. (en línea). Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. Asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. Consultado el 17 de septiembre del 2010. Disponible en: http://www.uach.cl/facultad/agrarias/instituto/prod_sanidad_vegetal/Lab_Bio_Mol/TesisColletotrichum.htm

Rosales, I. 2002 (en línea). Diagnóstico de Enfermedades en Plantas: uso de herramientas moleculares. Perú. Unidad de Biotecnología .INIA-CRI La Platina. Disponible en: http://www.inia.cl/biotecnologia/news/Biotecnologia_en_diagnostico_enfermedades.pdf Consultado 12 de febrero del 2012.

Rosas, C. 2009. (Tesis) CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Colletotrichum* sp ASOCIADAS CON *Lupinus mutabilis* EN ECUADOR. IASA- ESPE Sangolquí, Ecuador.

Simmonds, J.H. (1965). A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science 22: 437-459. Ulloa, M. y Hanlin, T. 2001. Illustrated dictionary of mycology. St. Paul, Minnesota: APS Press. p. 87, 108, 130, 164, 266.

Véliz, F. 2005. Caracterización molecular de aislamientos de *Colletotrichum* sp. causante de antracnosis en lupino (*Lupinus sp.* L) mediante marcadores ITS-RFLPs y RAPDs. Universidad Austral De Chile Facultad De Ciencias Agrarias Escuela De agronomía, Valdivia, Chile.

Vinuesa, P. 2009. Introducción a la Inferencia Filogenética, Programa de Ingeniería Genómica, CCG, UNAM, Intro. Biol. Filogenética - Posgrado CBioQuim - UNAM, Inst. de Biotecnología, Mar/Abr09.

Zambrano, A. 2006. (En línea). El tomate de árbol y el peligro de las plagas. Consultado el 17 de septiembre de 2010, disponible en:
<http://www.elagro.com.ec/ediciones/agro130/pdf/elagro130-363738.pdf>.