

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**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.**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ANA LUCÍA ALARCÓN MENA

SANGOLQUÍ, 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Ana Lucía Alarcón Mena

COORDINADOR DE LA CARRERA

M.Sc. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Carlos Orozco Bravo M.Sc.

Lugar y fecha : _____

CERTIFICACIÓN

Certifico:

Que el trabajo titulado, “**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**” realizado por Ana Lucía Alarcón Mena, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Fecha

PhD. César Falconí

DIRECTOR

M.Sc. Abraham Oleas

CODIRECTOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo al AMOR,

Al Amor maravilloso de Cristo Jesús,

Al Amor incondicional de mis Padres, Nancy y Germán

Al Amor desinteresado de mis hermanos, Alex y Katty

Al Amor e inocencia de mis mascotas, Paris y Jacinto

Ana Lucía Alarcón Mena

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Ser más maravilloso de este mundo a Jesús, por darme la vida y por haber derramado Bendiciones sobre mí, solo a ti sea la honra y gloria de todo Señor.

A mis tan amados Padres Nancy y Germán, por apoyarme moral, económica y espiritualmente en mis éxitos y fracasos, por haber inculcado en mí todos los valores haciendo de mí una mujer de bien, por enseñarme que después de una caída por más dura que haya sido debo levantarme.

A mí querido hermano Alex, mi mejor amigo, mi motivación a ser cada día mejor, ser ejemplo, gracias por tu apoyo incondicional.

A mí amiga y hermana Katty, por todos los momentos que hemos compartido, por enseñarme que una verdadera amistad es posible y que puede durar mucho más que cualquiera pudo haber imaginado.

A mis abuelitos, Luis Alberto, Zoila, Vicente, y Esther, por ser la esencia de mí ser.

A mis tíos, tías, primos, primas y familia en general por formar parte de mi inspiración.

A la Familia Miño Alarcón, por haber hecho de su casa un segundo hogar para mí, y por haberme brindado su amistad.

A mis amigas y amigos quienes marcaron una diferencia en mi vida dentro y fuera de clases.

A mi madre Espiritual Elizabeth Aguilar por su apoyo, enseñanza y espiritualidad y a su familia.

A Marcela Díaz por haberme brindado tan grata amistad , apoyo y ayuda incondicional.

A mi grupo VALLE VERDE, por ser mi apoyo espiritual, y mis ganas de crecer.

A tan prestigiosa Institución “Escuela Politécnica Del Ejército” y a todos los que conforman la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por haberme facilitado los conocimientos necesarios para ser una buena profesional.

De la misma manera agradezco a la Facultad de Ciencias agropecuarias “IASA” por haberme dado la oportunidad de realizar mis prácticas profesionales y mi proyecto de Tesis.

A mi director Phd. César Falconí, y a mi codirector Msc. Abraham Oleas por haber compartido su conocimiento y encontrado en mí el talento profesional que poseo.

A Msc. Pablo Landázuri por haberme brindado su amistad y confianza en el laboratorio.

Ana Lucía Alarcón Mena

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	II
CERTIFICACIÓN	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE DE CUADROS	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XVII
CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES	1
1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER.....	2
1.3 OBJETIVOS	3
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
CAPITULO II	5
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	5
<i>2.1 COLLETOTRICHUM</i>	5
2.1.1 Generalidades	5
2.1.2 Morfología y Generalidades.....	6
2.1.3 Desarrollo de la enfermedad	7
2.1.3.1 Germinación y formación del apresorio.....	7

2.1.3.2 Formas de penetración	9
2.1.3.3 Infección y colonización de los tejidos vegetales.....	9
2.1.3.4 Patógenos Hemibiotróficos.	10
2.1.3.5 Patógenos subcuticulares intramurales	10
2.1.3.6 Desarrollo y reproducción necrotrófica	11
2.1.4 Estrategias de la infección de <i>Colletotrichum</i> spp.	12
2.1.4.1 Fuentes de inóculo.	12
2.2 La antracnosis en chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>).....	12
2.2.1 El chocho como hospedero.	12
2.2.1.1 Origen.	12
2.2.1.2 Taxonomía.....	13
2.2.1.3 Producción.....	13
2.2.1.4 Síntomas de antracnosis.	14
2.2.1.5 Ciclo de vida de <i>Colletotrichum</i> en lupinos.	14
2.3 La antracnosis en tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	15
2.3.1 Origen.	15
2.3.2 Taxonomía.....	16
2.3.3 Producción.....	16
2.3.4 Síntomas de antracnosis.	17
2.4 METODOS DE DIAGNOSTICO E IDENTIFICACIÓN DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.	17
2.4.1 Sensibilidad a benomyl.....	17
2.4.2 Técnicas moleculares.....	18
2.4.2.1 Marcadores Moleculares.	18
2.4.2.2 Amplificación de regiones ITS.....	19
CAPITULO III	22

MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DONDE SE REALIZARON LOS ENSAYOS.	22
3.1.1 FASE DE LABORATORIO	22
3.1.1.1 UBICACIÓN POLITICA	22
3.1.1.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA	22
3.1.1.3 UBICACIÓN ECOLÓGICA.....	22
3.1.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DEL PATÓGENO	23
3.1.2.1 PROVINCIA DE COTOPAXI.....	23
3.1.2.1.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA	23
3.1.2.1.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DE RECOLECCIÓN DEL PATÓGENO DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI	23
3.1.2.2 PROVINCIA DE IMBABURA	24
3.1.2.2.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA	24
3.1.2.2.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DE RECOLECCIÓN DEL PATÓGENO DE LA PROVINCIA DE IMBABURA.....	24
3.1.2.3 PROVINCIA DE PICHINCHA	24
3.1.2.3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA	24
3.1.2.3.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DE RECOLECCIÓN DEL PATÓGENO DE LA PROVINCIA DE IMBABURA.....	25
3.2 RECOLECCIÓN DEL PATÓGENO	25
3.2.1 MÉTODO.....	25
3.3 REALIZACIÓN DE CÁMARA HUMEDA	26
3.3.1 MÉTODO.....	26
3.4 AISLAMIENTO DE <i>Colletotrichum</i> spp. DEL MATERIAL VEGETAL ENFERMO	26
3.4.1 MÉTODOS	26
3.5 OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	27

3.5.1 MÉTODO.....	27
3.6 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	28
3.6.1 MÉTODOS	28
3.7 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A BENOMYL	29
3.7.1 MÉTODO.....	29
3.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	30
3.8.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>Colletotrichum</i> spp.	30
3.8.1.1 MÉTODO.....	30
3.8.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN DE <i>Colletotrichum</i> spp.	31
3.8.2.1 CUANTIFICACIÓN CON QUBIT FLOUROMETER	31
3.8.2.2 CUANTIFICACIÓN POR ELECTROFORESIS	31
3.8.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	32
3.8.3.1 MÉTODO.....	32
3.9 DETERMINACIÓN DEL RANGO DE HOSPEDEROS	34
3.9.1 SIEMBRA DE CHOCHO Y TOMATE DE ÁRBOL EN INVERNADERO .	34
3.9.1.1 TOMATE DE ÁRBOL	34
3.9.1.2 CHOCHO	34
3.9.2 INOCULACIÓN DE <i>Colletotrichum</i> spp. EN LAS PLANTAS DE CHOCHO Y TOMATE DE ÁRBOL SEMBRADAS.	35
3.9.2.1 MÉTODO.....	35
 CAPITULO IV	 37
RESULTADOS.....	37
4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	37
4.1.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA CUALITATIVA DE <i>Colletotrichum</i> spp. de <i>L. mutabilis</i> (chocho).....	37
4.1.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA CUANTITATIVA DE <i>Colletotrichum</i> spp. de <i>Lupinus mutabilis</i> (chocho).....	39

4.1.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA CUALITATIVA DE <i>Colletotrichum</i> spp. de <i>S. betaceum</i> (tomate de árbol).....	41
4.1.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA CUANTITATIVA DE <i>Colletotrichum</i> spp. de <i>S. Betaceum</i> (tomate de árbol)	43
4.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A BENOMYL	45
4.2.1 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A BENOMYL DE AISLAMIENTOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. DE <i>L. mutabilis</i> (chocho).....	45
4.2.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A BENOMYL DE AISLAMIENTOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. DE <i>S. betaceum</i> (tomate de árbol)	46
4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA DE <i>Colletotrichum</i> spp. AISLADOS DE <i>L. mutabilis</i> (chocho).	48
4.3.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE CONIDIA DE <i>Colletotrichum</i> spp. AISLADOS DE <i>L. mutabilis</i> (chocho)	48
4.3.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE CONIDIA DE <i>Colletotrichum</i> spp. AISLADOS DE <i>S. betaceum</i> (tomate de árbol).....	49
4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Colletotrichum</i> spp.	50
4.4.1 CUANTIFICACIÓN DE ADN DE <i>Colletotrichum</i> spp., AISLADO DE <i>L. Mutabilis</i> (chocho).	50
4.4.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN DE <i>Colletotrichum</i> spp., AISLADO DE <i>S. betacea</i> (tomate de árbol) POR ELECTROFORESIS	52
4.5 ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS PCR DE ADN DE <i>Colletotrichum</i> spp. .	53
4.6 ANALISIS DE SECUENCIAS.....	55
4.6.1 ANALISIS DE SECUENCIAS ITS-1 CON EL PROGRAMA BLAST	55
4.6.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS ITS-1 CON EL PROGRAMA MEGA 5.0	56
4.7 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	57

4.7.1 ANALISIS DE VARIANZA DE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN PLANTAS DE <i>L. mutabilis</i> (chocho) INOCULADAS CON <i>C. acutatum</i> AISLADO DEL MISMO HOSPEDERO.....	57
4.7.2 ANALISIS DE VARIANZA DE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN PLANTAS DE <i>L. mutabilis</i> (chocho) INOCULADAS CON <i>C. acutatum</i> AISLADO DE <i>S. betacea</i> (tomate de árbol).	58
4.7.3 ANALISIS DE VARIANZA DE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN PLANTAS DE <i>S. betacea</i> (tomate de árbol) INOCULADAS CON <i>C. acutatum</i> AISLADO DE <i>L. mutabilis</i> (chocho).....	59
4.7.4 ANALISIS DE VARIANZA DE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN PLANTAS DE <i>S. betacea</i> (tomate de árbol) INOCULADAS CON <i>C. acutatum</i> AISLADO DEL MISMO HOSPEDERO.....	60
CAPITULO V	61
DISCUSIÓN	61
CAPITULO VI	65
CONCLUSIONES	65
CAPITULO VII	68
RECOMENDACIONES	68
CAPITULO VIII.....	69
RESUMEN	69
CAPITULO IX	70
ABSTRACT	70
CAPITULO X	71

BIBLIOGRAFÍA.....	71
-------------------	----

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro. 4.1. Caracterización morfológica cualitativa de 30 aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. aislados de chocho (<i>L. mutabilis</i>) recolectados en tres provincias.	38
Cuadro. 4.2. Grupos de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> de chocho en base al crecimiento del micelio.	39
Cuadro. 4.3. Caracterización morfológica cuantitativa, de acuerdo al área de crecimiento de <i>Colletotrichum</i> spp. aislado de chocho (<i>L. mutabilis</i>) recolectado en las tres provincias.	40
Cuadro. 4.4. Caracterización morfológica cualitativa de 30 aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. aislados de tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>) recolectado en tres provincias.	42
Cuadro. 4.5. Grupos de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> de tomate de árbol en base al crecimiento del micelio.	43
Cuadro. 4.6. Caracterización morfológica cuantitativa, de acuerdo al área de crecimiento de <i>Colletotrichum</i> spp. aislado de tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>) recolectado en las tres provincias.	44
Cuadro. 4.7. Tasa de crecimiento de 30 aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp., de chocho (<i>L. mutabilis</i>) en medio PDA + benomyl (500 mg/l), después de 5 días de incubación a 26 °C.	45
Cuadro. 4.8. Tasa de crecimiento de 30 aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp., de tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>) en medio PDA + benomyl (500 mg/ l), después de 5 días de incubación a 26 °C.	47
Cuadro. 4.9. Morfología microscópica cualitativa y cuantitativa de conidias de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. de chocho (<i>L. mutabilis</i>).....	48
Cuadro. 4.10. Morfología microscópica cualitativa y cuantitativa de conidias de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. de tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>).	50
Cuadro. 4.11. Concentración de ADN de 9 muestras.....	51
Cuadro. 4.12. Concentración de ADN de 9 muestras.....	53
Cuadro. 4.13. Análisis blast de las secuencias ITS1.	55

Cuadro. 4.14. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en plantas <i>de L. mutabilis</i> inoculadas con <i>C. acutatum</i> del mismo hospedero.	58
Cuadro. 4.15. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en plantas <i>de L. mutabilis</i> inoculadas con <i>C. acutatum</i> de <i>S. betaceum</i>	58
Cuadro. 4.16. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en plantas <i>de S. betaceum</i> inoculadas con <i>C. acutatum</i> de <i>L. mutabilis</i>	59
Cuadro. 4.1. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en plantas <i>de S. betaceum</i> inoculadas con <i>C. acutatum</i> del mismo hospedero.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 2.1. Sintomatología característica de antracnosis en <i>Lupinus mutabilis</i>	7
Figura. 2.2. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum</i> spp.	8
Figura. 2.3. Ciclo de vida del hongo causante de la antracnosis en lupino	15
Figura. 2.4. Mapa del ARN ribosomal	20
Figura. 2.5. Reacción de la polimerasa en cadena	21
Figura. 3.1. Mapa de la Provincia de Cotopaxi.	23
Figura. 3.2. Mapa de la Provincia de Imbabura.	24
Figura. 3.3. Mapa de la Provincia de Pichincha.	25
Figura. 4.1. Visualización de ADN de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. de chocho (<i>L. mutabilis</i>) seleccionados por su tamaño	51
Figura. 4.2. Visualización de ADN de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. de tomate de árbol (<i>S. betaceum</i>) seleccionados por su tamaño	52
Figura. 4.3. Visualización de productos PCR de ADN de <i>Colletotrichum</i> spp. aislado de chocho (<i>L. mutabilis</i>)	54
Figura. 4.4. Visualización de productos PCR de ADN de <i>Colletotrichum</i> spp., aislado de tomate de árbol (<i>S. Betaceum</i>)	54
Figura. 4.5. Dendrograma de secuencias ITS1 pertenecientes a especies del género <i>Colletotrichum</i>	56
Figura. 4.6. Matriz de distancias genéticas de las secuencias analizadas.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla. 3.1.	Descripción macro y microscópica del patógeno.....	29
Tabla. 3.2.	Preparación de soluciones para PCR.....	33
Tabla. 3.3.	Escala para la evaluación de la severidad de infección.....	36

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

El chocho también conocido como lupino o tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) se origina de la zona andina de Sudamérica, siendo así la única especie americana de éste género domesticada y cultivada como una leguminosa (Blanco, 1982). Esta especie está distribuida desde Colombia hasta el norte de Argentina. 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). Esta especie pertenece al grupo de las frutas semiáridas. Tiene forma ovoide, mide alrededor de 8 cm de largo y 5 cm de diámetro, los colores de la pulpa son variados (Repo y Encina, 2008). 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 nutraceúticos ricos en fibra (Repo y Encina, 2008). Otros estudios muestran que el Tomate de árbol contiene antioxidantes entre 2,16 y 2393,72mg/100 g de muestra fresca (Repo y Encina, 2008). Por esta razón esta especie es importante en el consumo humano.

El área cosechada de chocho en el Ecuador es de 3.921 hectáreas y la producción obtenida fue de 787 toneladas por año (MAG, 2006). El área cosechada de tomate de árbol en el Ecuador es de 4.500 a 6.000 hectáreas, las mismas que han tenido un rendimiento de 40.000 a 50.000 kg/ha/año (Zambrano, 2006). Se considera a la Sierra Ecuatoriana como la región principal para la producción de chocho en especial las Provincias de Pichincha, Chimborazo e Imbabura (Jacobsen y Sherwood, 2002) datos que corrobora el Ministerio de Agricultura (MAG, 2006). En cuanto a las provincias en donde hay mayor producción de tomate de árbol tenemos a Imbabura y El Carchi (Zambrano, 2006).

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.

1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER

El beneficio de obtener granos de chocho y fruto de tomate de árbol de buena calidad, es condición prioritaria para el productor, ya que puede beneficiarse económicamente. En el campo y en la época de post cosecha se observa el efecto negativo de las especies del género *Colletotrichum*, este patógeno ataca una gran variedad de cultivos tropicales y subtropicales (Rodríguez, 2007). Cuando este patógeno afecta a los frutos, las estructuras reproductivas germinan sobre la superficie, ingresan a las capas externas y provocan maceración y muerte de los tejidos adyacentes, lo que provoca pérdida en la producción por reducción de la calidad y cantidad de frutos a ser cosechados (Rodríguez, 2007).

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), minimizando costos de producción y mejorando la calidad de los granos en el caso de chocho y del fruto en el caso del tomate de árbol.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológica, patológica y molecularmente aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis en *Lupinus mutabilis* (chocho) y *Solanum betacea* (tomate de árbol) en las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura, Ecuador.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las características morfológicas de las cepas de *Colletotrichum* spp. utilizando criterios macro y microscópicos de las colonias y conidias.
- Determinar molecularmente por medio de cebadores específicos ITS-PCR la especie de *Colletotrichum* spp.

- Determinar la relación filogenética entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. de chocho y tomate de árbol utilizando secuencias de ITS1-ITS4
- Determinar el rango de hospederos de aislamientos de *Colletotrichum* spp. mediante inoculaciones en plantas de tomate de árbol y plantas de chocho, en invernadero.
- Divulgar la tecnología generada a través de un artículo científico o un boletín técnico

CAPITULO II

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 COLLETOTRICHUM

2.1.1 Generalidades

Colletotrichum está implicado en enfermedades de plantas especialmente con antracnosis alrededor del mundo. Además por tener la habilidad para causar infecciones latentes, se ha ubicado a *Colletotrichum* entre los patógenos más importantes en campo y en post cosecha (Bailey y Jeger, 1992). El género *Colletotrichum* fue establecido por Corda en 1831 (Contreras, 2006).

En la actualidad el taxón se encuentra constituido por 39 especies (Sutton, 1992) entre saprófitos y parásitos. Las especies patogénicas han causado serias pérdidas en un amplio número de cultivos perennes en regiones tropicales y subtropicales debido a la presencia de lesiones causadas por la antracnosis.

Según Agrios (2005), la clasificación taxonómica de *Colletotrichum* spp. es: Dominio Eukaryota, Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Clase Filamentous Ascomycetes (III) Deuteromycetes u hongo Mitospóricos, del Género *Colletotrichum* en estado anamorfo.

Según National Center of Biotechnology Information (NCBI), (2010) y Caracterización Molecular por la región ITS 1 –ITS4, *Colletotrichum* spp. se encuentra en : Dominio Eukaryota, Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes Subclase Sordariomycetes incertae sedis, Orden

Phyllachorales Familia Phyllachoraceae, Subfamilia Phyllachoraceae mitosporico
Género *Colletotrichum* (Estado Anamorfo).

El hongo crece con facilidad en papa dextrosa agar (PDA), inicialmente la colonia es cremosa y de color salmón, emitiendo un micelio blanco en sus bordes que con el tiempo se torna grisáceo. Alcanza su desarrollo completo luego de 15 días a una temperatura de 25 y 26° C (Bailey y Jeger, 1992).

2.1.2 Morfología y Generalidades

El género *Colletotrichum*, morfológicamente presenta conidias hialinas (7-20 x 2.5-5 µm), unicelulares y fusiformes que se encuentran ubicadas en una estructura reproductiva llamada acérvulo (500 µm de diámetro). Estos cuerpos son en forma de disco, cerosos, subepidermales. Además de conidióforos y conidias, el hongo presenta setas en el borde del acérvulo o entre conidióforos, aunque a veces están ausentes (Bailey y Jeger, 1992 citado por Botero, 1999).

Colletotrichum spp. presenta un micelio enramado, toma una coloración que varía desde hialina hasta castaño pálido. Los acérvulos son separados en forma de disco. (Barnett, 1998 y Holliday, 1995).

Las setas son originadas en el pseudoparénquima, los conidióforos son septados y ramificados sobre la base de color café claro y son originadas por la parte superior del pseudoparénquima. Las conidias también son aseptadas y de forma cilíndrica las mismas que durante la germinación se tornan de color café pálido, se septan y forman el apresorio, por lo general las esporas son tan numerosas que llegan a formar masas brillantes de color rosado o salmón (Blanchard *et al.*, 1992 y Holliday, 1995).

Colletotrichum spp, tiene diferente forma de comportamiento pudiendo ser saprófito y luego llegar a ser completamente patógeno, llegando a tener un amplio rango de hospederos. Los conidios al ser producidos en masas mucilaginosas por lo general son de color rosado y tiene un contorno irregular en las lesiones necróticas sobre frutos,

hojas y demás tejido de una planta siendo esta la evidencia de antracnosis (Contreras, 2006).

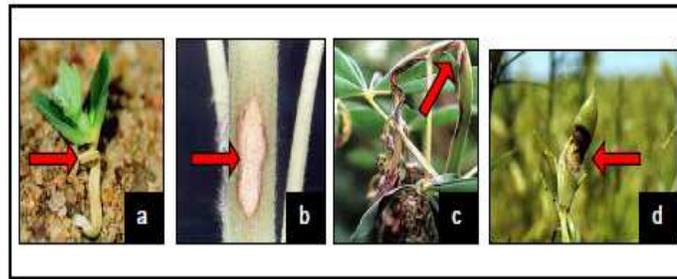


Figura. 2.1. Sintomatología característica de antracnosis en *Lupinus mutabilis*. a) Torcedura del hipocótilo, b) Lesión en tallo, c) y d) Necrosis en vainas (Véliz, 2005).

2.1.3 Desarrollo de la enfermedad

2.1.3.1 Germinación y formación del apresorio.

El proceso de infección de *Colletotrichum* spp. involucra una secuencia de eventos (Dodd et al., 1989). El inoculo en la mayoría de los casos llega a su hospedero por medio del agua o por dispersión de los conidios que se adhieren a la cutícula de la planta y germinan en un periodo de un día, produciéndose el tubo germinal cuyo tamaño oscila entre 10-20 μm , antes de formar el apresorio terminal, que directamente penetra la cutícula, las dos fuentes de inoculo son los conidios y las ascosporas producidos en acérvulos y peritecios, respectivamente. Las dos fuentes de infección que utiliza *Colletotrichum* spp. , es la colonización intracelular, o la colonización intramural subcuticular (**figura 2.2**).

Después de haberse depositado en la superficie de la planta, donde los conidios y ascosporas experimentan una síntesis de proteínas realizándose así una diferenciación

compleja, dando lugar a la germinación proceso fundamental para la infección (Bailey y Jeger, 1992).

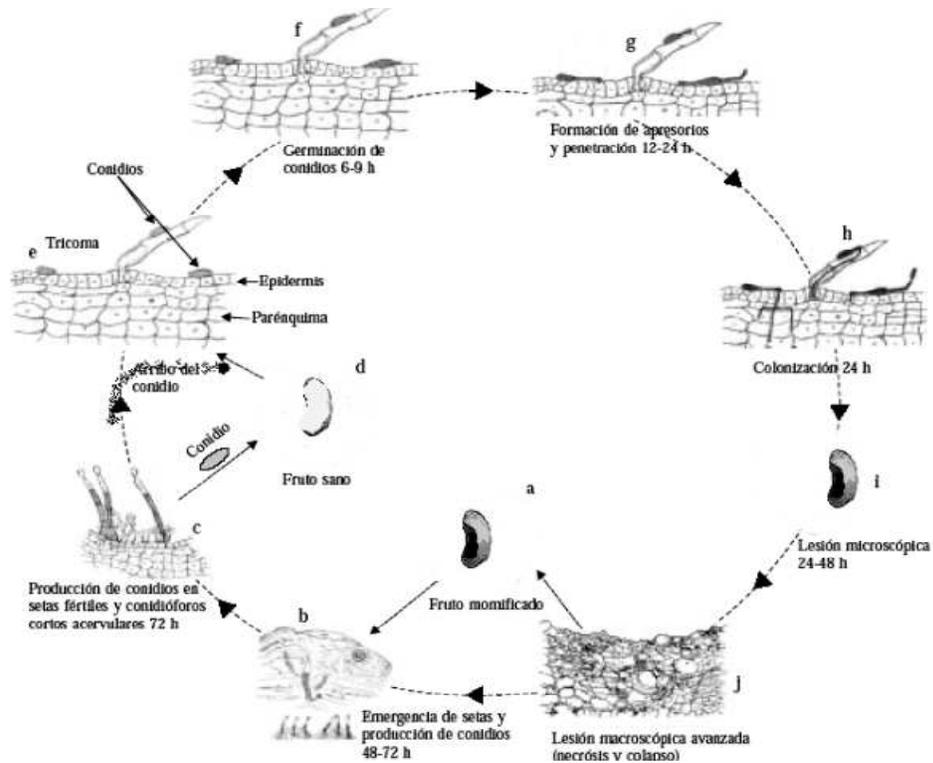


Figura. 2.2. Ciclo de vida de *Colletotrichum* spp. (Agrios, 2005).

La formación del apresorio es un requisito fundamental para la penetración directa a la superficie del hospedero ya que juega un rol importante para que el patógeno pueda sobrevivir. Los procesos de germinación de conidios, formación del apresorio, y la formación de hifas infectivas son procesos independientes que actúan como estimuladores o inhibidores en las plantas hospederas. Los apresorios pueden ser globosos, o no tener lóbulos y su tamaño puede ser variado, los apresorios están formados por capas compuestas de carbohidratos y melanina la misma que se encarga de darle un color oscuro y aparentemente protege al apresorio de la irradiación pero con certeza está involucrada en los procesos de penetración (Bailey y Jeger, 1992).

El proceso de formación del apresorio está acompañado por la secreción de una sustancia mucilaginosa a su alrededor, que junto con la matriz de esporas se

comprometen en la protección del apresorio en especial durante la adhesión a la superficie del hospedero (Bailey y Jeger, 1992).

2.1.3.2 Formas de penetración

Colletotrichum spp. ingresa a su hospedero a través de aperturas naturales como los estomas, a través de heridas, o por penetración directa de la barrera cuticular, siendo esta la forma más común (Contreras, 2006). Después de este proceso el crecimiento de *Colletotrichum* spp. se restringe en la capa epidérmica, presentándose así un periodo de latencia. Cuando los frutos maduran producen tejidos que promueven la reactivación del patógeno, produciéndose de esta manera la enfermedad (Contreras, 2006).

2.1.3.3 Infección y colonización de los tejidos vegetales

Muchas especies de *Colletotrichum* presentan en dos fases su proceso infectivo inicialmente con una fase asintomática, estableciéndose en los tejidos del hospedero y finalmente se da una fase destructiva visible. En la fase asintomática el patógeno va invadiendo las células sin matarlas, razón por la cual se ha considerado a varias especies de *Colletotrichum* como hemibiotróficas.

Al examinar las lesiones de *Colletotrichum* spp. con microscopía electrónica, se puede observar que la hifas se encuentran a través de los tejidos presentando la decoloración de las células y la degradación de las paredes celulares del hospedero. Las hifas pueden estar dentro de las células, dentro de la pared celular y en espacios intracelulares. La eficacia del microorganismo es evidente debido a la cantidad de patógeno y tejido destruido (Contreras, 2006).

2.1.3.4 Patógenos Hemibiotróficos.

El inicio de la fase biotrófica en estas especies hemibiotróficas de *Colletotrichum* spp., es seguida de una fase necrotrófica, que inicia con la aparición de una hifa secundaria que se ramifica a través del tejido del hospedero inter e intracelularmente, en ciertos casos las células hospederas mueren rápidamente de acuerdo al avance de la infección, y las paredes celulares son degradadas por enzimas fúngicas despolimerizadoras.

En la fase biotrófica de interacción, se evidencia la producción de un micelio inicial (micelio primario) y la transición a un micelio secundario. Las hifas aumentan su tamaño hinchándose formando así vesículas de infección; la membrana plasmática del hospedero se invagina alrededor de la vesícula infectiva, los protoplastos permanecen vivos durante este proceso y la hifas primarias colonizan progresivamente nuevas células. La matriz interfacial que separa la membrana plasmática de la planta de la pared celular fúngica se mantiene y nuevamente infecta las células que están viables (Adaskaveg *et al.*, 1997; Whatton *et al.*, 2004).

A partir de las 48 horas después de la penetración inicial, se forma la hifa necrotrófica la cual no tiene capa matricial. Las células que contienen hifas primarias y secundarias, la membrana plasmática y la matriz alrededor de la hifa primaria se desintegran. La hifa secundaria tiene enzimas que degradan la pared celular en su avance, se dispersan y se expanden rápidamente dando lugar a lesiones necróticas (Mendgen y Hahn, 2002).

2.1.3.5 Patógenos subcuticulares intramurales

Algunas especies de *Colletotrichum* spp. crecen bajo la cutícula y dentro de la pared periclinal de las células epidérmicas, durante el estado inicial de la infección. En este tipo de infección se forma el apresorio melanizado después de que las esporas germinan, desarrollándose así la hifa de penetración. La cutícula del hospedero es penetrada y las hifas del hongo se diseminan subcuticularmente dentro de las paredes de

las células epidérmicas del hospedero, disolviendo así la estructura de la pared, seguida por la muerte celular. Durante los estados finales de la infección, las hifas penetran las células epidérmicas y mesófilas causando la muerte de las células hospederas (Whatton *et al.*, 2004).

Durante las primeras 24 horas después de la penetración, no se pueden evidenciar síntomas, similarmente a lo que ocurre en el estado inicial de la infección hemibiotrófica.

Después del crecimiento hifal dentro de la pared anticlinal de la capa de las células epidérmicas y dentro de las paredes de las células corticales, se produce una red intramural a través del tejido de hifas en las siguientes 48 horas (Contreras, 2006).

2.1.3.6 Desarrollo y reproducción necrotrófica

Cuando *Colletotrichum* spp. coloniza exitosamente los tejidos del hospedero por medio de la infección hemibiotrófica y/o intramural, el patógeno crece activando un comportamiento necrotrófico clásico. La fase necrotrófica es responsable de los síntomas de la antracnosis. Durante este estado el patógeno crece extensamente a través del tejido del hospedero, dentro de las células, en paredes, a través de las paredes y en espacios intercelulares (Mendgen y Hanh, 2002).

Otro aspecto importante en esta fase es que las cutículas de los frutos afectados permanecen intactas, sugiriendo que las cutinasas están involucradas en la penetración inicial de la superficie del hospedero, por lo que la subsecuente síntesis y actividad de enzimas debe ser inhibido. La cutícula intacta puede tener la función de mantener el patógeno dentro del tejido infectado (Contreras, 2006). La producción tanto del acérvulo como del peritecio sobre la superficie del hospedero requiere una cutícula intacta (Mendgen y Hanh, 2002).

2.1.4 Estrategias de la infección de *Colletotrichum* spp.

2.1.4.1 Fuentes de inóculo.

En acérvulos y peritecios jóvenes, las conidias y ascosporas están encerradas en un material húmedo mucilaginoso (matriz), la cual es un complejo mixto, compuesto en su mayoría por polisacáridos, glicoproteínas y en su minoría por algunas enzimas (Bailey *et al.*, 1992). Cuando esta estructura reproductiva madura se encuentra bajo condiciones secas, la matriz forma una corteza dura, la cual mantiene a las esporas juntas (Bailey *et al.*, 1992).

La diseminación de esporas desde acérvulos jóvenes ocurre a través de gotas de lluvia, mientras que el viento puede distribuir masas de esporas secas proveniente de acérvulos viejos y ascosporas desde peritecios (Nicholson y Moraes 1980 citado por Bailey *et al.*, 1992). Por otra parte insectos de las órdenes *Diptera*, *Coleoptera* y *Homoptera*, también son considerados factores de dispersión ya que las esporas pueden adherirse a su cuerpo y transportar hacia un fruto o al suelo (Contreras, 2006).

Mientras las esporas permanecen dentro del acérvulo, la matriz es la encargada de prevenir la germinación prematura de las esporas, asegurando así la distribución del inóculo. Hay también evidencias de que la matriz mantiene viables a las esporas bajo condiciones de baja humedad, protegiéndolas de altas temperaturas, luz ultravioleta y efectos de metabolitos tóxicos de otras plantas (Nicholson *et al.* 1986 citado por Bailey *et al.*, 1992).

2.2 LA ANTRACNOSIS EN CHOCHO (*LUPINUS MUTABILIS*)

2.2.1 El chocho como hospedero.

2.2.1.1 Origen.

El chocho (*Lupinus mutabilis*) se originó en la zona andina de Sudamérica. Esta leguminosa es la única especie americana del género *Lupinus* domesticada y cultivada

(Blanco *citado por* Jacobsen y Sherwood 2002). Su distribución comprende desde Colombia hasta el norte de Argentina, aunque actualmente es de importancia sólo en Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (FAO *citado por* Jacobsen y Sherwood 2002). En Ecuador el cultivo del chocho se encuentra ubicado en una franja altitudinal que va desde los 2500 msnm, hasta 3400 y 3600 con riesgos de heladas y granizadas (Caicedo y Peralta, 2000).

El chocho es también cultivado en algunos ambientes contrastantes alrededor del mundo, bajo la influencia y severidad de plagas y enfermedades. En Australia, Chile, Sur África y Sureste de Europa esta leguminosa se desarrolla en regiones con clima mediterráneo. Estos ambientes favorecen a hongos y plagas para una buena sobrevivencia y adaptabilidad a un verano seco y cálido, a pesar de no existir plantas hospederas ni restos de cosecha o semilla.

2.2.1.2 Taxonomía.

Clasificación sistemática del chocho según Gross (1982) corresponde al Orden Rosales (Fabales), Suborden Leguminosinae, Requiri Leguminosae (Fabaceae), Subfamilia Papilionatae (Faboideae) Papilionatae, Lotoideae, Tribu Genisteae, Subtribu Genistinae (Crotalarilinae), Género *Lupinus*, Subgénero Eulupinus, Espécie *Lupinus mutabilis* SWEET

2.2.1.3 Producción.

La producción del chocho depende de diversos factores por ejemplo, la precocidad, desarrollo de inflorescencias en el tallo principal, inflorescencia de las ramas axilares sucesivas, del número de vainas por inflorescencia, del número de semillas por vaina, tamaño de la semilla y de la madurez de la vaina (Hondelmann, 1984). En Ecuador según estadísticas obtenidas en III Censo Nacional Agropecuario, la producción de chocho fue de 789 toneladas para el año 2000. Encontrándose el 100% de la producción en la región sierra, teniendo como zonas productoras Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha e Imbabura (Junovich, 2003).

Australia es actualmente el país que produce la mayor cantidad de chocho a nivel mundial, cuenta con el 61% de la superficie total (Junovich, 2003). La producción de lupino en ese país fue cerca de 1.4 millones de toneladas en 1995, con una producción estimada de 24 millones de toneladas para el año 2000 (Perry *et al.*, 1998). Por tanto, la productividad del chocho en Australia es cerca de 1.076 Kg/ha (Junovich, 2003).

2.2.1.4 Síntomas de antracnosis.

Las lesiones de antracnosis pueden desarrollarse sobre todas las partes de la planta de chocho cultivado o silvestre. El síntoma más distintivo es el doblamiento o torcedura del tallo central con una lesión sobre la zona doblada. Esta es particularmente observable cuando el cultivo está floreciendo. Las lesiones de los tallos son generalmente de color café oscuro y de hasta 2 cm de largo. Las masas de esporas son rosadas o algunas veces anaranjadas y se desarrollan sin existir lesiones. El tallo se observa en ocasiones completamente torcido o debilitado hasta romperse. Ambos el tallo principal y ramas laterales pueden ser afectados. Las lesiones en hojas no son numerosas pero pueden ser vistas como manchas con bordes café oscuros. La semilla infectada puede estar mal formada, tener micelio sobre la superficie, o en ocasiones tener masas de esporas de color rosado. Las semillas también pueden estar infectadas con antracnosis y no mostrar síntomas (Geoff, 2003).

2.2.1.5 Ciclo de vida de *Colletotrichum* en lupinos.

La infección inicial viene de esporas o micelio transportados en semilla infectada (el hongo puede sobrevivir más de dos años dentro de la semilla). Las plántulas que emergen de semilla infectadas pueden desarrollar lesiones sobre tallo, hipocotilo, cotiledones, peciolo de hojas o tallos (**Figura 2.3**).

Luego de unos pocos días, las lesiones producen esporas en abundancia, las cuales son diseminadas por gotas de lluvia. La mayoría de esporas se dispersan solamente unos pocos metros, pero algunas pueden trasladarse mayores distancias por efecto de fuertes vientos, maquinaria agrícola, animales e insectos. Cuando las

condiciones climáticas no son las apropiadas las esporas se protegen en una matriz durante el tiempo de invierno ya que las lluvias disminuyen la viabilidad del hongo. Las esporas necesitan una película de humedad en la superficie de la planta por lo menos cuatro horas hasta germinar y penetrar el tejido. Una mayor infección resultará cuando existan largos periodos de humedad. Luego de la penetración, el hongo coloniza los tejidos de la planta y a los pocos días ya se observan las lesiones. Humedad y temperatura incrementan los síntomas y producción de esporas (Geoff, 2003).

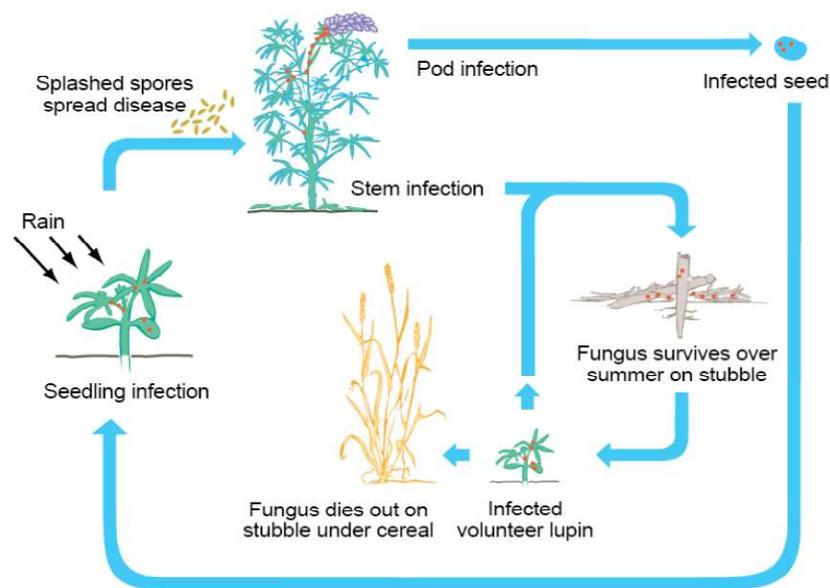


Figura. 2.3. Ciclo de vida del hongo causante de la antracnosis en lupino (Geoff, 2003).

2.3 LA ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL (*SOLANUM BETACEUM*)

2.3.1 Origen.

El género *Cyphomandra*, al cual pertenece el tomate de árbol, abarca entre 35 y 50 especies originarias de América tropical, en latitudes que van desde los 20 °N hasta

los 30 ° S encontrándose dispersas especialmente en América del Sur (García *et al.*, 2002 citado por León, 2004).

Hasta hace pocos años, muchos autores mantenían que el tomate de árbol era nativo de la región andina, principalmente de la vertiente oriental de Ecuador y Perú (León, 2004), investigaciones recientes señalan que el tomate de árbol cultivado, está estrechamente relacionado con un complejo de materiales silvestres bolivianos de acuerdo a evidencias moleculares, estudios morfológicos y datos de campo, por lo cual los ecotipos se cree se originaron en esa región (León, 2004).

2.3.2 Taxonomía.

El tomate de árbol es conocido internacionalmente como “tamarillo” en Nueva Zelanda y Estados Unidos, “Baum tomate” en Alemania, “tomate de cera” o “chimango” en Portugal, “tree tomatoe” en Inglaterra, “Straiktomaad” o “terog blanda” en Holanda, “tomate de arbree” en Francia, “tomate de árbol” o “tomate de ají” en España (León, 2004).

La clasificación sistemática del tomate de árbol según Bohs (1995) citado por León (2004) corresponde al Reino Vegetal, División Fanerógamas, Subdivisión Angiospermas, Clase Dicotiledóneas, Subclase Metaclamideas, Orden Tubiflorales, Familia Solanaceae, Género *Solanum* (*Cyphomandra*), Especie *Solanum betaceum*.

2.3.3 Producción.

En el país, el cultivo de tomate de árbol lo realizan principalmente pequeños y medianos productores, que han incrementado en la última década la superficie cosechada de 1370 ha en 1993 a 3250 ha en 1997, mientras que en el censo del 2001 se reportó 4 062 ha de cultivo. El incremento en área ha sido paulatino año tras año, no así los rendimientos que han mantenido tendencia a la baja entre 13, 8 y 5.5 t/ha en los años señalados, siendo las causas principales de las pérdidas problemas ocasionados por plagas y enfermedades (INEC-MAG-SICA, 2002 citado por León, 2004).

2.3.4 Síntomas de antracnosis.

La antracnosis conocida como “ojo de pollo”, está ampliamente distribuida en las zonas productoras, considerada por muchos productores como la enfermedad más importante del cultivo ya que produce pérdidas de hasta un 90%. Tiene mayor incidencia en épocas lluviosas y con temperaturas promedio entre 13 y 15°C y humedad ambiental del 95% (León, 2004).

Los síntomas pueden presentarse sobre todo a nivel de frutos en diferentes estados de desarrollo, los cuales muestran inicialmente decoloración y pequeñas lesiones de apariencia aceitosa, que progresivamente se tornan pardas o negras, con bordes bien definidos, ligeramente hundidas, en el centro de la lesión se forma un polvillo rosado a salmón, que corresponde a la esporulación del hongo. Posteriormente las lesiones se van uniendo y llegan a cubrir gran parte del fruto, que se seca y toma la apariencia de momificado. En las hojas los síntomas de antracnosis se presentan como manchas con anillos concéntricos de color oscuro y bordes definidos (León, 2004).

2.4 METODOS DE DIAGNOSTICO E IDENTIFICACIÓN DE COLLETOTRICHUM SPP.

2.4.1 Sensibilidad a benomyl

Esta técnica de identificación ha sido empleada para estimar el potencial de los benzimidazoles en el control químico. Este método se puede utilizar para una caracterización adicional de poblaciones de *Colletotrichum* spp., asociadas con antracnosis (Freeman et al., 1998), esta prueba permite diferenciar entre *C. acutatum* y *C. gloeosporoides*, aunque ésta puede confirmarse con técnicas moleculares ya que *Colletotrichum* spp, puede presentar resistencia a productos químicos (Contreras, 2006).

2.4.2 Técnicas moleculares

El ADN es una molécula que contiene el código genético, siendo sus propiedades el reflejo directo de la identidad genotípica y fenotípica de cada organismo, esta molécula es utilizada en la identificación de las especies debido a que está menos influenciada por los efectos ambientales. Un fragmento de ADN, que representa variación genética (polimorfismo) debido a diferencias entre individuos en la longitud o secuencia de la doble cadena en un locus particular se denomina marcador molecular los mismos que son muy estables y útiles en la identificación de especies y poblaciones (Lewin, 2004). El uso de técnicas moleculares ha posibilitado la distinción entre especies del género *Colletotrichum* spp. siendo esta una herramienta más confiable para construir la clasificación de éste género. En los estudios del género *Colletotrichum* spp. se ha concentrado en dos partes del genoma mitocondrial (ADNm) y ribosomal (ADNr), ambos presentes como múltiples copias en la célula (Rodríguez, 2007).

2.4.2.1 Marcadores Moleculares.

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el DNA (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). En cuanto a los marcadores moleculares para detectar la diversidad genética en *Colletotrichum* spp. se han utilizado cebadores arbitrarios (Bridge *et al.*, 1998). Estos cebadores han servido para identificar *C. acutatum* y *C. gloeosporoides* de cítricos y también *C. acutatum* que provienen de un alto rango de hospederos que fueron agrupados y delineados del aislamiento de *C. gloeosporoides* usando cebadores específicos de *C. acutatum*. Similarmente utilizando cebadores específicos de *C. gloeosporoides* y *C. fragariae*, los aislamientos de estas dos especies se distinguieron de los *C. acutatum*.

2.4.2.2 Amplificación de regiones ITS

La PCR es una reacción enzimática en cadena que conlleva a la amplificación de secuencias de ADN específico de un ADN molde determinado, además se necesitan dos oligonucleótidos o cebadores aproximadamente de 20 nucleótidos de longitud, cuya secuencia debe ser complementaria al ADN molde. La amplificación se realiza en presencia de dNTPs como sustrato y la reacción es catalizada por la Taq polimerasa.

La secuencia entre las dos regiones complementarias a los cebadores es sintetizada al repetir los ciclos, los cuales consisten en una serie de temperaturas, donde el ADN es denaturado, los cebadores se alinean y se lleva a cabo la polimerización de la secuencia específica o amplicón (Rodrigues, 2006) (**figura 2.4**).

Según Ferreira y Grattapaglia (1995) un marcador molecular se define como: “todo fenotipo molecular oriundo de un gen expresado o de un segmento específico de ADN”. Es decir, toda variabilidad de naturaleza bioquímica o molecular susceptible de ser de algún modo asociada con la variabilidad de algún parámetro morfológico y/o agronómico (Campos, 1995).

La detección e identificación de hongos usando partidores que amplifiquen regiones del espacio transcrito interno del ADN ribosomal o Internal Transcribed spacer (ITS), han sido ampliamente usados en estudios de sistemática, debido a la poca confiabilidad de caracteres morfológicos, los cuales hasta ahora habían sido utilizados para la delimitación de taxas (Dauch *et al.*, 2003).

En estudios previos, las regiones del ADNr 5,8S y los espaciadores transcritos internos ITS 1 e ITS 2 junto con la técnica de RFLP, han resultado una gran ayuda a la identificación molecular de especies de *Colletotrichum*, (Abang *et al.*, 2002 y Orberá, 2004). En estos estudios se ha utilizado una variante de la técnica conocida como ITS-RFLP. Para ello se amplifican fragmentos específicos del ADN ribosomal, es decir, las regiones ITS, por medio de la reacción PCR para luego ser tratados con endonucleasas de restricción para obtener patrones específicos (Horton, 2002).

Las endonucleasas de restricción, son enzimas que generan fragmentos de ADN de tamaño moderado, mediante el corte de la hebra de ADN en sitios específicos, usualmente secuencias palindrómicas (Campos, 1995).

La región 5,8S; 18S y 28S es conservada y muestra una baja variabilidad, sin embargo la región de los ITS que es una zona hipervariable permite el reconocimiento a nivel interespecífico (**figura 2.5**). Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distinto tamaño los que son examinados por electroforesis (Orberá, 2004).

Teniendo en cuenta que los métodos tradicionales han sido poco satisfactorios para la diferenciación entre especies y subespecies de *Colletotrichum* spp., las técnicas moleculares se están utilizando para este propósito; es así como actualmente se ha determinado la secuencia de nucleótidos de la región ITS1 de varias especies de *Colletotrichum* spp. para construir cebadores específicos, que utilizados con el cebador de secuencia conservada ITS4 amplifican por PCR determinados segmentos de ADN, y permiten diferenciar especies del complejo *Colletotrichum* (Freeman, Katan y Shabi, 1998; Adaskaveg y Hartin, 1997).

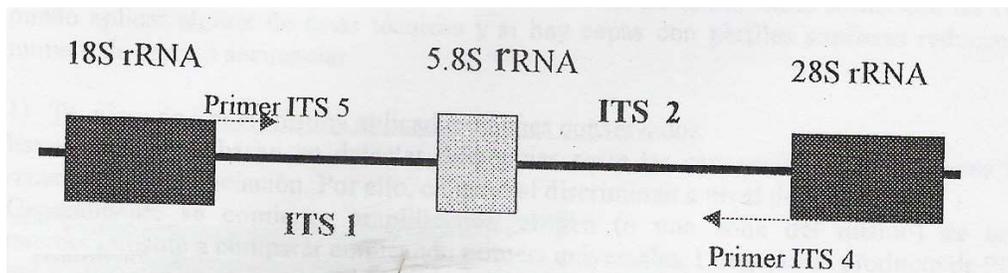


Figura. 2.4. Mapa del ARN ribosomal (Rosas, 2009)

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DONDE SE REALIZARON LOS ENSAYOS.

3.1.1 FASE DE LABORATORIO

3.1.1.1 UBICACIÓN POLITICA

La investigación se realizó en el laboratorio de Control Biológico, ubicado en las instalaciones de la Hacienda El Prado, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias de la ESPE, ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, ciudad de Sangolquí.

3.1.1.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El laboratorio esta geoposicionado en: Latitud $0^{\circ} 23' 28,29''$ S y Longitud $78^{\circ} 24' 48,72''$ (Estación Meteorológica IASA, 2009).

3.1.1.3 UBICACIÓN ECOLÓGICA

Las instalaciones donde se realizó la investigación se ubican en el piso altitudinal bosque montano bajo del Norte de la Sierra, temperatura promedio de 14°C , pluviosidad anual 1285mm, altitud 2748 msnm y humedad relativa promedio de 69%.

3.1.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DEL PATÓGENO

3.1.2.1 PROVINCIA DE COTOPAXI

3.1.2.1.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La Provincia de Cotopaxi se ubica en el centro norte de la cordillera de los Andes, se asienta en la hoya central oriental del Río Patate. La hoya que ocupa la provincia de Cotopaxi es la cuarta desde el norte. La Provincia de Cotopaxi tiene 7 cantones (**Figura 3.1**).



Figura. 3.1. Mapa de la Provincia de Cotopaxi. FUENTE: Dirección de planificación GPP (2005)

3.1.2.1.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DE RECOLECCIÓN DEL PATÓGENO DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI

El muestreo del patógeno en la Provincia de Cotopaxi, se realizó en las parroquias Sigchos, y Santa Ana, con las siguientes coordenadas geográficas:

Sigchos L1: N0759635, E 991774

Santa Ana L2: N0762995, E 9915886

Santa Ana L3: N0763132, E 9915941

3.1.2.2 PROVINCIA DE IMBABURA

3.1.2.2.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La provincia de Imbabura está ubicada al extremo norte del Ecuador en la región Interandina o Sierra, con una superficie de 4986 km². La capital es Ibarra que a su vez es el cantón más importante (**Figura 3.2**).



Figura. 3.2. Mapa de la Provincia de Imbabura. FUENTE: Dirección de planificación GPP (2005)

3.1.2.2.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DE RECOLECCIÓN DEL PATÓGENO DE LA PROVINCIA DE IMBABURA

El muestreo en la Provincia de Imbabura, se realizó en el Cantón Cotacachi, con las siguientes coordenadas geográficas.

Cotacachi: N 0°17'51" O 78°16'7

3.1.2.3 PROVINCIA DE PICHINCHA

3.1.2.3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La Provincia de Pichincha se encuentra ubicada en la región Ecuatorial de los altos Andes, hacia la parte norte del territorio ecuatoriano (Lara, 2002) (**Figura 3.3**).



Figura. 3.3. Mapa de la Provincia de Pichincha. FUENTE: Dirección de planificación GPP (2005)

3.1.2.3.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DE RECOLECCIÓN DEL PATÓGENO DE LA PROVINCIA DE IMBABURA

El muestreo en la Provincia de Pichincha, se realizó en el Cantón Rumiñahui, y Cantón Quito, parroquias que se encuentran en sus alrededores, con las siguientes coordenadas geográficas.

San Fernando L1: N0787779, O 9957436

Tumbaco L2: S 0°12'36", O 78°24'00" W

Guayllabamba L3: N18430 36870, E 722600 750430

3.2 RECOLECCIÓN DEL PATÓGENO

3.2.1 MÉTODO

Con la ayuda de un equipo GPS se localizaron las coordenadas de donde se recolectaron las muestras de tallos de *Lupinus mutabilis* (chocho) y frutos de *Solanum betaceum* (tomate de árbol) infectados con antracnosis en las tres provincias (Falconí, 1998).

Se procedió a buscar plantas con signos de antracnosis, con la tijera podadora se cortó la parte de la planta afectada, estas muestras fueron colocadas en las fundas plásticas, que posteriormente fueron etiquetadas de acuerdo al lugar de recolección. Las muestras se transportaron al laboratorio de Control Biológico (Falconí, 1998).

3.3 REALIZACIÓN DE CÁMARA HUMEDA

3.3.1 MÉTODO

El material vegetal recolectado fue lavado con agua corriente se removió residuos de tierra, polvo e insectos. Después fue colocado en un frasco con una solución de jabón líquido y se agitó suavemente, se repitió este procedimiento dos veces para que el material infectado se limpie completamente, nuevamente se lavó con agua corriente para eliminar residuos de jabón. El material vegetal fue colocado en tarrinas pequeñas en donde también se colocó pequeños pedazos de algodón húmedo, las tarrinas fueron tapadas, etiquetadas de acuerdo al lugar de recolección y selladas con parafilm, se dejó reposar este material vegetal por cuatro días (Falconí, 1998).

3.4 AISLAMIENTO DE *COLLETOTRICHUM* SPP. DEL MATERIAL VEGETAL ENFERMO

3.4.1 MÉTODOS

Se preparó inicialmente una solución de 39 g/l de medio de agar papa dextrosa (PDA) y se esterilizó a una temperatura de 121°C y 20 PSI de presión por 20 minutos. Después de enfriar se disolvió una cápsula de Cloranfenicol (antibiótico) se colocó una dosis aproximada de 50 a 200 ppm (Quintero *et al.*, 2008). Dentro de cámara de flujo el

medio fue dispensado colocando aproximadamente 20 ml en cajas petri plásticas estériles, se dejó reposar en cámara hasta que solidifique el medio.

El material vegetal fue retirado de la cámara húmeda y se colocó sobre un pedazo de papel toalla observando la lesión, después se realizó un lavado con agua destilada estéril y un lavado con una solución de cloro al 5% sumergiendo el material por un minuto para finalmente realizar un último lavado con agua destilada estéril. El material vegetal lavado fue colocado sobre papel toalla, y con la ayuda de una pinza y bisturí estéril se realizaron cortes en la lesión del material, las mismas que fueron sembradas en las cajas con PDA, luego fueron etiquetadas, selladas y llevadas a incubación por cinco días a 26°C (Falconí,1998).

3.5 OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS DE *COLLETOTRICHUM SPP.*

3.5.1 MÉTODO

Se preparó una solución de 39 g/l de PDA, y se siguió el procedimiento de preparación previamente descrito. Con la ayuda una micropipeta se recogió 300 µl de agua destilada estéril, y se colocó en un tubo eppendorf.

Dentro de cámara de flujo, se localizó la lesión cubierta de esporas o a su vez una colonia con abundante esporulación, con un asa de transferencia punta redonda se desprendieron esporas de la lesión, las mismas que fueron disueltas en agua destilada estéril en el tubo eppendorf, se agitó por 30 segundos con vortex, obteniéndose una suspensión de esporas.

En la superficie de una caja petri vacía se colocaron cinco gotas de agua destilada estéril, con un asa de transferencia punta redonda se tomó una gota de la suspensión de esporas y se colocó sobre una de las gotas y se transfirió la gota de

solución de esporas a la siguiente gota hasta llegar a la última gota, la misma que se transfirió a una caja petri con medio solidificado haciendo un rayado. Se tapó la caja petri y se procedió a observar en el estereomicroscopio.

Se localizaron esporas aisladas, en cámara de flujo se abrió la caja petri; con un sacabocados y asa de transferencia se recogió el pedazo de agar en donde se localizaron las esporas aisladas, las mismas que fueron inoculadas en otra caja petri con PDA. Se incubó a una temperatura de 26°C por los siguientes 5 días (Falconí, 1998).

3.6 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE *COLLETOTRICHUM* SPP.

3.6.1 MÉTODOS

Después de 5 días de incubación se procedió a observar en el microscopio y constatar que se trataba de un cultivo puro. Después se realizó un raspado con el asa de transferencia. Se realizó nuevamente una suspensión de esporas repitiendo el procedimiento anteriormente descrito y con una micropipeta de 20µl se absorbió 15 µl de esta suspensión y se colocó en una caja petri con PDA, la misma que fue tapada, etiquetada e incubada a 26°C por 5 días.

Después de este período, en cámara de flujo se realizó la descripción macroscópica cualitativa (color, forma, presencia o ausencia de anillos o halos concéntricos) y cuantitativa (tamaño) del patógeno. Se realizó una medición de los diámetros de cada aislamiento. El color de las colonias se determinó a través de la carta de colores de Munsell (1994).

La forma y el tamaño de las conidias se observaron, utilizando un microscopio óptico. Se tomó cada aislamiento y se hizo un pequeño raspado que fue colocado un portaobjetos, se colocó una gota de fenol- lactosa, se cubrió con el cubre objetos y se observó en el microscopio óptico con ocular micrométrico para realizar mediciones de las conidias (**Tabla 3.1**).

Tabla. 3.1. Descripción macro y microscópica del patógeno

COLONIA	MICELIO	CONIDIAS
Cepa	Crecimiento	Forma
Color	Aspecto	Color
Forma	Color	Tamaño
Pigmentación	Tasa de crecimiento	Forma de esporulación

En la caracterización microscópica se evaluó la forma y el tamaño de las conidias según lo propuesto por Barnett (1998). Se observaron 10 conidias por campos y en cada montaje se analizarán 10 campos (Sutton, 1992).

Los aislamientos se replicaron 10 veces con la finalidad de conservarlos. Para conservar las cepas por más tiempo con la ayuda de unas pequeñas rodajas de papel filtro esterilizado y una pinza se adhirieron las esporas a las rodajas de papel filtro y se guardaron en viales, los mismos que fueron refrigerados a 4 ° C. De esta forma se obtuvo un banco referencial de cada cepa (Falconí, 1998).

3.7 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A BENOMYL

3.7.1 MÉTODO

Se preparó un litro de PDA (39 g/l), se autoclavó a una temperatura de 121°C y 20 PSI de presión por 20 minutos, se enfrió y se disolvió una cápsula de Cloranfenicol (antibiótico) se colocó una dosis aproximada de 50 a 200 ppm (Quintero *et al.*, 2008). También se disolvieron 500 mg de Benomyl en un litro de PDA preparado, finalmente se dispensó alrededor de 20 ml en cada caja petri plástica esteril,

y se dejó solidificar. También se prepararon cajas petri con PDA y cloranfenicol sin Benomyl para realizar los testigos.

Con la suspensión de esporas de *Colletotrichum* spp. previamente obtenidas en un tubo eppendorf se tomó un volumen de 15µl y se colocaron en cajas petri dispensadas con medio PDA con benomyl para la prueba y sin benomyl para realizar los respectivos testigos. Se etiquetó de acuerdo a la provincia que cada patógeno pertenecía y se incubó por 5 días a 26°C. Pasado éste período se procedió a observar el crecimiento del patógeno, se midieron los diámetros y se comparó con el diámetro de crecimiento de los testigos (Falconí, 1998).

3.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *COLLETOTRICHUM* SPP.

3.8.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE *Colletotrichum* spp.

3.8.1.1 MÉTODO

Se realizó un raspado de micelio de los aislamientos seleccionados y se colocó dentro de un mortero. Se sumergió en nitrógeno líquido, se trituró con el pistilo hasta que el nitrógeno se evapore y el micelio se convierta en polvo. Se recogió con un bisturí y se colocó dentro de un tubo eppendorf de 1,5 ml, se añadió los reactivos del kit (E.Z.N.A . Fungal DNA Kit), en el siguiente orden, primero 600µl del tampón FG1 con 5µl de RNasa, y 10µl de 2-mercaptoetanol, y se agitó vigorosamente con Vortex. Después se incubaron los tubos a baño maría a 65°C durante 10 minutos y se realizó una mezcla mediante una inversión de tubo (E.Z.N.A . Fungal DNA Kit , 2007).

Se agregó 140 µl del tampón FG2, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos, se centrifugó a 10000 gravedades por 10 minutos, se recogió 600µl del sobrenadante en un tubo eppendorf de 2ml. Se colocó 300µl de tampón FG3 y se agitó suavemente con vortex, se añadió 600µl de etanol absoluto y nuevamente se agitó.

Se recogieron 800 µl del contenido del tubo colocándose en una columna y se centrifugó a 10000 gravedades por 1 minuto, se eliminó líquido que traspasó el filtro de la columna y repitió este último paso, se agregó 750µl de wash buffer a la columna, se centrifugó a la misma velocidad y tiempo, el líquido filtrado por la columna fue eliminado, y se repitió este paso, la columna fue secada por medio de centrifugación a velocidad máxima por dos minutos.

Se transfirió la columna a un tubo eppendorf nuevo y se añadió a la columna 100 µl del tampón eluyente precalentado en baño maría a 65°C. Se incubó a baño maría por 5 minutos a la misma temperatura, se dejó reposar a temperatura ambiente por un minuto y se centrifugó a 10000 gravedades por un minuto. Se obtuvo la fracción A de ADN de *Colletotrichum* spp. Para obtener la fracción B se repitió este paso en la misma columna en un diferente tubo (E.Z.N.A . Fungal DNA Kit 2007).

3.8.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN DE *Colletotrichum* spp.

3.8.2.1 CUANTIFICACIÓN CON QUBIT FLOUROMETER

Para la cuantificación de ADN se necesitaron dos tubos estándar que contenían la solución de trabajo en base a la mezcla entre el reactivo Quant-iT, con una proporción de 1:200 en el tampón Quant-It. Se utilizaron 200µl de reactivo de trabajo para cada muestra.

En cada tubo se colocó 190µl de la solución de trabajo, y se añadió 10µl de la muestra de ADN del patógeno. Se agitó vigorosamente con el vortex por unos tres segundos, se incubaron los tubos a temperatura ambiente, y se procedió a leerlos con el Qubit Fluorometer (Qubit Instruction Manual, 2009).

3.8.2.2 CUANTIFICACIÓN POR ELECTROFORESIS

Se preparó con anticipación los tampones TAE 10X y 1X. Para preparar el tampón más concentrado (TAE 10X) se pesó 48,40g de Tris Base, 4,10g de acetato de sodio y 2,92 g etilendiaminotetra acetato de sodio y se disolvió en un litro de agua

destilada. Para preparar el tampón más diluido (TAE 1X) se utilizó 100 ml de TAE 10X y se disolvió en 900 ml de agua destilada. Se preparó la cámara de electroforesis, colocando la cama del gel en una posición horizontal y se colocaron los peines. Después se pesó 0,8 g de agarosa ultra pura y se disolvió en 100 ml de TAE 1X, se calentó y se dispensó sobre la cama del gel hasta que se solidifique. Se retiró suavemente los peines y se colocó el gel en forma horizontal sobre la cámara, se dispensó el tampón TAE 1X hasta que cubra completamente el gel.

En el gel se colocaron 4µl de ADN de cada muestra del patógeno con 1 µl de bluejuice. Así mismo se colocaron 5 µl de marcador de cuantificación. Se corrió el gel a 100 voltios, 500 miliamperios durante una hora.

Después el gel fue colocado en una fuente que contenía una mezcla de tampón TAE 1X con 30µl de bromuro de Etidio, y se dejó teñir por una hora. Finalmente se realizó la visualización en el transiluminador (CIMMYT, 2006).

3.8.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *Colletotrichum* spp.

3.8.3.1 MÉTODO

Éste proceso se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar, después de haber confirmado la existencia de ADN en buena cantidad y calidad, y se preparó la solución madre de PCR (**Tabla 3.2**).

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 µl de la solución madre, y después se añadió la cantidad de ADN indicada en la tabla 3.2, 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).

Tabla. 3.2. Preparación de soluciones para PCR

REACTIVO	V. inicial Muestra 1	Muestras 2	Muestras 4
Buffer	5 µl	10 µl	20 µl
MgCl	2 µl	4 µl	8 µl
DNTPs	0.4 µl	0.8 µl	1.6 µl
ITS 1	0.25 µl	0.5 µl	1 µl
ITS 4	0.25 µl	0.5 µl	1 µl
Taq polimerasa	0.4 µl	0.4 µl	0.4 µl
Agua MQ	33.7 µl	67.4 µl	134,8 µl
DNA	8 µl	8 µl	8 µl
TOTAL	50 µl	≈ 50 µl/muestra	≈ 50 µl/muestra

Los productos PCR obtenidos fueron visualizados en el transiluminador UV, después de haber realizado la electroforesis, de la misma manera como se realizó en el paso de cuantificación, se tiñó con bromuro de etidio y realizó la visualización en el transilumandor. Después de haber confirmado la cantidad y calidad de producto PCR, las muestras fueron enviadas a Macrogen Estados Unidos cuyos resultados fueron enviados por correo electrónico de parte de Macrogen, y se publicaron en: http://www.macrogenusa.com/MOD/eng/data_access.jsp?uI=macrogen2426&oN=111017UMDN-050&fn=111017UMDN-050.zip

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.

3.9 DETERMINACIÓN DEL RANGO DE HOSPEDEROS

3.9.1 SIEMBRA DE CHOCHO Y TOMATE DE ÁRBOL EN INVERNADERO

3.9.1.1 TOMATE DE ÁRBOL

Para iniciar se preparó la fibra de coco en un recipiente, se mezcló con agua hasta que se homogenice. Se preparó una mezcla de un litro de agua destilada con 1g. de kristalón y 1 g. de vitavax, y se mezcló con la fibra de coco hidratada, la cual se colocó cuidadosamente en el pilón. Se sembró una semilla de tomate de árbol en cada hoyo del pilón, se elaboró un micro invernadero con plástico y alambre, el mismo que fue colocado en el cuarto de crecimiento por tres semanas.

Después se cortó poco a poco el plástico transparente, y se regó agua pasando un día. Al observar crecimiento se trasplantó a una maceta cada una de las planta. Cada maceta contenía mezcla de tierra negra con fibra de coco en una proporción de 50:50. Se regaron con agua cada dos días. Así se obtuvieron unas plantas de tomate de árbol con 3 meses de edad.

3.9.1.2 CHOCHO

La siembra de chocho se realizó directamente en una mezcla de tierra negra, cascarilla de arroz, fibra de coco, y arenilla en una proporción 1:1:1:1. La mezcla se colocó cuidadosamente en las macetas, se procedió a sembrar cuatro semillas de chocho por cada maceta, y se regó cada dos días. Al observar crecimiento se procedió a amarrar los tallos con la parte superior del invernadero. Se obtuvieron plantas de chocho de 1 mes y medio de edad.

3.9.2 INOCULACIÓN DE *Colletotrichum* spp. EN LAS PLANTAS DE CHOCHO Y TOMATE DE ÁRBOL SEMBRADAS.

3.9.2.1 MÉTODO

Se preparó una solución de cloruro de sodio al 0,85%, se colocó en tubos de ensayo, se colocó 1 µl de solución sobre una cepa de *Colletotrichum* spp. y con el asa de transferencia se mezcló con esporas. Se tomó 1 µl de esta solución y se transfirió a un tubo de ensayo, se colocó una gota de esta solución en el hematocitómetro, y se cuantificó el promedio de esporas por mL (Falconí, 1998).

Después de llegar con todas las cepas a una concentración de 10^5 , con la ayuda del asa de transferencia recta se procedió a realizar punciones sobre las plantas de chocho y tomate de árbol, haciendo una pequeña herida. Con la ayuda de una micropipeta se colocó 1 µl de la solución de esporas preparada, y se etiquetó la planta de acuerdo a la cepa que fue inoculada (Falconí, 1998).

Después de dos semanas de haber inoculado se analizó la severidad de las lesiones ocasionadas por el patógeno (**Tabla 3.3**) para realizar el respectivo análisis estadístico.

Los resultados se dispusieron en un Diseño Completamente al azar, donde se inocularon tres cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. de chocho y tres cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. de Tomate de árbol. La unidad experimental fue la maceta que contenía 4 plantas que correspondían a las submuestras, en cada planta se realizaron 3 heridas para inocularlas con los respectivos patógenos. Se realizaron doce tratamientos con tres repeticiones con cuatro submuestras. Los datos fueron analizados mediante ANOVA con una prueba de Duncan al 5% para comparación de incidencia y separación de medias.

Tabla. 3.3. 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

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE *COLLETOTRICHUM* SPP.

4.1.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA CUALITATIVA DE *Colletotrichum* spp. de *L. mutabilis* (chocho)

Se obtuvieron diez aislamientos de *Colletotrichum* spp., asociados a las antracnosis de *Lupinus mutabilis* (chocho). Los resultados de la morfología de las tres provincias se presentan en el **(cuadro 4.1)**.

De los 30 aislamientos el 93 % obtuvieron forma circular, el 6,6% presentaron forma ovular. El color de la colonia en el haz fue blanco combinado con gris y en el envés fue verde oscuro para el 100% de la población. El micelio en todos los aislamientos presentó forma algodonosa y color blanco crema mezclado con gris. El anillo pronunciado correspondió al 60% de la población, el 20% de los aislamientos presentó anillo semi pronunciado y el 20% restante presentó anillo no pronunciado.

Cuadro. 4.1. Caracterización morfológica cualitativa de 30 aislamientos de *Colletotrichum* spp. aislados de chocho (*L. mutabilis*) recolectados en tres provincias¹.

PROVINCIA	AISLAMIENTO	COLONIA		MICELIO		
		FORMA	COLOR	FORMA	ANILLO	COLOR
COTOPAXI	CcA1	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	CcA2	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	CcA3	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	CcA4	ovular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	CcA5	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	CcA6	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	CcA7	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	CcA8	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	CcA9	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	CcA10	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
IMBABURA	IcA1	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	IcA2	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	IcA3	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	IcA4	ovular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	IcA5	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	IcA6	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	IcA7	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	IcA8	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	IcA9	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	IcA10	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
PICHINCHA	PcA1	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PcA2	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	PcA3	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PcA4	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PcA5	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PcA6	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PcA7	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	PcA8	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	PcA9	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PcA10	circular	h:blanco y gris e:verde y gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris

Fuente: Alarcón, 2012.

¹ h:haz, e: envés

4.1.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA CUANTITATIVA DE *Colletotrichum* spp. de *Lupinus mutabilis* (chocho)

De los 7854 mm² correspondientes al área total de la caja petri, el aislamiento de mayor crecimiento (IcA6) alcanzó el 35,4% (**Cuadro 4.3**). Este aislamiento corresponde al de mayor tamaño de la provincia de Imbabura y pertenece al grupo A (**Cuadro 4.2**).

Cuadro. 4.2. Grupos de aislamientos de *Colletotrichum* de chocho en base al crecimiento del micelio.

GRUPO	AREA	PORCENTAJE
GRUPO A	1614,30 - 1857,41	21,48 - 24,93
GRUPO B	1614,27 - 1614,29	18,02 - 21,47
GRUPO C	0- 1614,28	0 -18,01

El grupo A estuvo formado por los aislamientos de mayor área, el grupo B por los aislamientos que tuvieron un área intermedia, y el grupo C corresponde a los aislamientos de menor área de crecimiento. Los tres aislamientos más significativos de cada provincia están marcados con el respectivo color, según el área de crecimiento. El color amarillo para el primero, el verde para el segundo y el rojo para el tercero, según el orden en el que varía el área de crecimiento. Estos nueve aislamientos fueron usados para realizar la caracterización molecular.

Cuadro. 4.3. Caracterización morfológica cuantitativa, de acuerdo al área de crecimiento de *Colletotrichum* spp. aislado de chocho (*L. mutabilis*) recolectado en las tres provincias.

PROVINCIA	AISLAMIENTO	AREA	% CRECIMIENTO	GRUPO
COTOPAXI	CcA1	962,12	11,9	C
	CcA2	1385,45	16,82	C
	CcA3	1256,64	16	C
	CcA4	1590,44	29,97	A
	CcA5	1809,56	23,04	A
	CcA6	2375,84	33,12	A
	CcA7	1256,64	18,12	B
	CcA8	1075,21	13,69	C
	CcA9	1734,95	22,56	A
	CcA10	1809,56	24,02	A
IMBABURA	IcA1	1590,44	20,25	B
	IcA2	1194,59	15,21	C
	IcA3	1256,64	16	C
	IcA4	2551,76	33,65	A
	IcA5	1963,5	30,5	A
	IcA6	2827,44	35,4	A
	IcA7	1590,44	22,62	A
	IcA8	2375,84	32,53	A
	IcA9	1590,44	22,62	A
	IcA10	2206,19	26,54	A
PICHINCHA	PcA1	1075,21	12,29	C
	PcA2	1194,59	15,6	C
	PcA3	1320,26	16,4	C
	PcA4	1963,5	25	A
	PcA5	1809,56	24,02	A
	PcA6	1734,95	23,54	A
	PA7	907,92	11,56	C
	PcA8	1075,21	14,06	C
	PcA9	1809,56	23,04	A
	PcA10	1134,12	14,065	C
PROMEDIO		1614,29	21,47	
D. ESTÁNDAR		497,93	7,09	

Fuente: Alarcón, 2012

4.1.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA CUALITATIVA DE *Colletotrichum* spp. de *S. betaceum* (tomate de árbol)

Se obtuvieron diez aislamientos de *Colletotrichum* spp., asociados a la antracnosis de *S. betaceum* (tomate de árbol) de tres provincias del Ecuador (**Cuadro 4.4**).

De los 30 aislamientos el 86,6% obtuvieron forma circular, el 13,3 % presentaron forma ovular. El color de la colonia en el haz fue anaranjado combinado con gris y en el envés se presentó una combinación de colores verde, salmón y gris para el 100% de la población.

El micelio en todos los aislamientos presentó forma algodonosa y color blanco crema mezclado con gris. El anillo pronunciado correspondió al 33,3% de la población, el 43,3% de los aislamientos presentó anillo semi pronunciado y el 23,3% restante presentó anillo no pronunciado.

Cuadro. 4.4. Caracterización morfológica cualitativa de 30 aislamientos de *Colletotrichum* spp. aislados de tomate de árbol (*S. betaceum*) recolectado en tres provincias².

PROVINCIA	AISLAMIENTO	COLONIA		MICELIO		
		FORMA	COLOR	FORMA	ANILLO	COLOR
COTOPAXI	CtA1	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	CtA2	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	CtA3	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	CtA4	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	CtA5	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	CtA6	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	CtA7	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	CtA8	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	CtA9	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	CtA10	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
IMBABURA	ItA1	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	ItA2	ovular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	ItA3	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	ItA4	ovular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	ItA5	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	ItA6	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	ItA7	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	ItA8	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	ItA9	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	ItA10	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
PICHINCHA	PtA1	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PtA2	ovular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PtA3	ovular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	PtA4	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PtA5	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	PtA6	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	PtA7	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	no pronunciado	blanco crema+ gris
	PtA8	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	semi pronunciado	blanco crema+ gris
	PtA9	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris
	PtA10	circular	h: anaranjado+ gris e: verde+salmón+gris	algodonoso	pronunciado	blanco crema+ gris

Fuente: Alarcón, 2012

² h:haz, e: envés

4.1.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA CUANTITATIVA DE *Colletotrichum* spp. de *S. Betaceum* (tomate de árbol)

De los 7854 mm² correspondientes al área total de la caja petri, el aislamiento de mayor crecimiento (CtA2) alcanzó el 53,1% (**Cuadro 4.6**). Este aislamiento correspondió al de mayor tamaño de la provincia de Cotopaxi y pertenece al grupo A (**Cuadro 4.5**).

Cuadro. 4.5. Grupos de los aislamientos de *Colletotrichum* de tomate de árbol en base al crecimiento del micelio.

GRUPO	AREA	PORCENTAJE
GRUPO A	1805,01-1805,12	18,04-22,10
GRUPO B	1410,48-1805	16-18,03
GRUPO C	0-1410,47	0- 13,95

El grupo A estuvo formado por los aislamientos de mayor área, el grupo B por los aislamientos que tienen un área intermedia, y el grupo C correspondió a los aislamientos de menor área de crecimiento.

Los tres aislamientos más significativos de cada provincia están marcados con el respectivo color, según el área de crecimiento. El color amarillo para el primero, el verde para el segundo y el rojo para el tercero, según el orden en el que varía el área de crecimiento. Estos nueve aislamientos fueron usados para realizar la caracterización molecular.

Cuadro. 4.6. Caracterización morfológica cuantitativa, de acuerdo al área de crecimiento de *Colletotrichum* spp. aislado de tomate de árbol (*S. betaceum*) recolectado en las tres provincias.

PROVINCIA	AISLAMIENTO	AREA	% CRECIMIENTO	GRUPO
COTOPAXI	CtA1	3318,32	42,25	A
	CtA2	5026,56	53,12	A
	CtA3	1590,44	16,97	B
	CtA4	1963,5	22,62	A
	CtA5	1256,64	16	B
	CtA6	962,12	14,12	C
	CtA7	1256,64	16	B
	CtA8	1256,64	18,12	B
	CtA9	1256,64	18,12	B
	CtA10	962,12	14,12	C
IMBABURA	ItA1	1256,64	16	B
	ItA2	962,12	14,12	C
	ItA3	1256,64	16	B
	ItA4	1134,12	15,22	B
	ItA5	1256,64	16	B
	ItA6	1256,64	16	B
	ItA7	1134,12	15,22	B
	ItA8	1256,64	16	B
	ItA9	1256,64	16	B
	ItA10	962,12	14,12	C
PICHINCHA	PtA1	1256,64	16	B
	PtA2	962,12	14,12	C
	PtA3	1256,64	16	B
	PtA4	1134,12	15,22	B
	PtA5	1256,64	16	B
	PtA6	1256,64	16	B
	PA7	1134,12	15,22	B
	PtA8	1256,64	16	B
	PtA9	1256,64	16	B
	PtA10	962,12	14,12	C
PROMEDIO		1410,48	18,03	
D. ESTÁNDAR		808,24	8,35	

Fuente: Alarcón, 2012

4.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A BENOMYL

4.2.1 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A BENOMYL DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp. DE *L. mutabilis* (chocho)

Cuadro. 4.7. Tasa de crecimiento de 30 aislamientos de *Colletotrichum* spp., de chocho (*L. mutabilis*) en medio PDA + benomyl (500 mg/l), después de 5 días de incubación a 26 °C.

PROVINCIA	AREA TESTIGO	AISLAMIENTO	AREAc ²	% crecimiento vs testigo
COTOPAXI	10,28 cm ²	CcA1	0,87	8,4459
		CcA2	1,33	12,9172
		CcA3	1,33	12,9172
		CcA4	0,57	5,5414
		CcA5	0,87	8,4459
		CcA6	0,44	4,3185
		CcA7	0,87	8,4459
		CcA8	1,06	10,2803
		CcA9	1,06	10,2803
		CcA10	0,64	6,2675
IMBABURA	9,72cm ²	IcA1	0,71	11,63
		IcA2	0,59	10,70
		IcA3	0,50	17,01
		IcA4	0,28	8,08
		IcA5	0,00	8,93
		IcA6	0,33	11,63
		IcA7	0,24	8,93
		IcA8	0,57	9,86
		IcA9	0,57	11,96
		IcA10	0,20	8,08
PICHINCHA	9,72cm ²	PcA1	1,04	8,08
		PcA2	0,64	12,64
		PcA3	0,71	11,96
		PcA4	0,79	8,93
		PcA5	0,00	9,09
		PcA6	0,00	9,78
		PcA7	0,00	8,08
		PcA8	0,00	12,64
		PcA9	0,00	10,87
		PcA10	0,00	5,86

Fuente: Alarcón, 2012

El área de crecimiento del testigo permitió identificar la tasa de crecimiento de los diferentes aislamientos. La tasa más alta de crecimiento varió entre 12 y 17 %, este último correspondiente al aislamiento IcA3 proveniente de la provincia de Imbabura.

El aislamiento CcA6 de la provincia del Cotopaxi obtuvo la menor tasa de crecimiento, mostrando un resultado del 4,3% (**Cuadro 4.7**). Mostrando a su vez un alta tasa de inhibición de crecimiento proporcionado por la dosis de benomyl en el medio.

4.2.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A BENOMYL DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp. DE *S. betaceum* (tomate de árbol)

El área de crecimiento del testigo permitió identificar la tasa de crecimiento de los diferentes aislamientos. La tasa más alta de crecimiento alcanzó el 86,79% que corresponde al aislamiento PtA1 proveniente de la provincia de Pichincha.

Varios aislamientos se inhibieron completamente en presencia de benomyl en el medio, como es el caso de seis aislamientos de la provincia de Pichincha y dos aislamientos de Imbabura y Cotopaxi. El aislamiento CtA5 de la provincia del Cotopaxi obtuvo la menor tasa de crecimiento, mostrando un resultado del 11,57% (**Cuadro 4.8**).

Cuadro. 4.8. Tasa de crecimiento de 30 aislamientos de *Colletotrichum* spp., de tomate de árbol (*S. betaceum*) en medio PDA + benomyl (500 mg/ l), después de 5 días de incubación a 26 °C.

PROVINCIA	AREA TESTIGO	AISLAMIENTO	AREA cm ²	% crecimiento vs testigo
COTOPAXI	1,39cm ²	CtA1	0,64	46,28
		CtA2	0,79	56,44
		CtA3	0,79	56,44
		CtA4	0,38	27,66
		CtA5	0,16	11,57
		CtA6	0,44	31,89
		CtA7	0,57	40,92
		CtA8	0,44	31,89
		CtA9	0,00	0,00
		CtA10	0,50	36,12
IMBABURA	1,59cm ²	ItA1	0,71	44,62
		ItA2	0,59	36,73
		ItA3	0,50	31,55
		ItA4	0,28	17,75
		ItA5	0,00	0,00
		ItA6	0,33	20,95
		ItA7	0,24	15,04
		ItA8	0,57	35,74
		ItA9	0,57	35,74
		ItA10	0,20	12,33
PICHINCHA	1,20cm ²	PtA1	1,04	86,79
		PtA2	0,64	53,06
		PtA3	0,71	59,28
		PtA4	0,79	65,50
		PtA5	0,00	0,00
		PtA6	0,00	0,00
		PtA7	0,00	0,00
		PtA8	0,00	0,00
		PtA9	0,00	0,00
		PtA10	0,00	0,00

Fuente: Alarcón, 2012

4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA DE *COLLETOTRICHUM* SPP. AISLADOS DE *L. MUTABILIS* (CHOCHO).

4.3.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE CONIDIA DE *Colletotrichum* spp. AISLADOS DE *L. mutabilis* (chocho)

Cuadro. 4.9. Morfología microscópica cualitativa y cuantitativa de conidias de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de chocho (*L. mutabilis*)

PROVINCIA	AISLAMIENTO	ASPECTO			TAMAÑO		
		FORMA	LADO1	LADO2	RADIO 1	RADIO2	AREA
COTOPAXI	CcA1	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,23	1,285	13,04
	CcA2	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,12	1,22	11,96
	CcA3	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,24	1,36	13,84
	CcA4	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	2,955	1,08	10,03
	CcA5	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,165	1,25	12,43
	CcA6	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,12	1,22	11,96
	CcA7	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,24	1,36	13,84
	CcA8	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,165	1,25	12,43
	CcA9	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,23	1,285	13,04
	CcA10	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	2,955	1,08	10,03
IMBABURA	IcA1	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,285	1,345	13,88
	IcA2	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,28	1,46	15,04
	IcA3	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,22	1,34	13,56
	IcA4	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,1	1,24	12,08
	IcA5	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,12	1,2	11,76
	IcA6	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,225	1,335	13,53
	IcA7	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,28	1,46	15,04
	IcA8	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,11	1,21	11,82
	IcA9	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,12	1,46	14,31
	IcA10	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,12	1,34	13,13
PICHINCHA	PcA1	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,28	1,3	13,40
	PcA2	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,28	1,5	15,46
	PcA3	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,22	1,38	13,96
	PcA4	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	2,96	1,1	10,23
	PcA5	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,04	1,22	11,65
	PcA6	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,28	1,21	12,47
	PcA7	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,285	1,46	15,07
	PcA8	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	2,965	1,115	10,39
	PcA9	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,255	1,39	14,21
	PcA10	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,25	1,16	11,84
						PROMEDIO AREA	12,85
						D.ESTANDAR	1,52

Fuente: Alarcón, 2012

Morfológicamente todas las conidias aisladas de *Colletotrichum* spp. de chocho presentaron forma ovoide, por un lado ahusado, y redondo por el otro.

Cuantitativamente se obtuvo un área promedio de $12,8 \mu\text{m}^2$ y una desviación estándar de 1,5, los aislamientos que mostraron mayor tamaño de las conidias fueron IcA2, IcA7 de Imbabura, y PcA2, PcA7 de la provincia de Pichincha, con áreas mayores a $15 \mu\text{m}^2$ (**Cuadro 4.9**).

4.3.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE CONIDIA DE *Colletotrichum* spp. AISLADOS DE *S. betaceum* (tomate de árbol)

Morfológicamente todas las conidias aisladas de *Colletotrichum* spp. de tomate de árbol presentaron forma ovoide, por un lado ahusado, y redondo por el otro.

Cuantitativamente se obtuvo un área promedio de $12,2 \mu\text{m}^2$ y una desviación estándar de 1,4. Los aislamientos que mostraron mayor tamaño de las conidias fueron CtA10 de la provincia de Cotopaxi, ItA3 de Imbabura, y PtA7 de la provincia de Pichincha, con áreas mayores a $14 \mu\text{m}^2$ (**Cuadro 4.10**).

Cuadro. 4.10. Morfología microscópica cualitativa y cuantitativa de conidias de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de tomate de árbol (*S. betaceum*).

PROVINCIA	AISLAMIENTO	ASPECTO			TAMAÑO		
		FORMA	LADO1	LADO2	RADIO 1	RADIO2	AREA
COTOPAXI	CtA1	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,24	1,32	13,45
	CtA2	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,12	1,2	11,78
	CtA3	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,16	1,38	13,72
	CtA4	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	2,78	1	8,75
	CtA5	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	2,98	1,14	10,69
	CtA6	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	2,95	1,3	12,06
	CtA7	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,2	1,2	12,08
	CtA8	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,15	1,225	12,14
	CtA9	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,205	1,35	13,61
	CtA10	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,24	1,4	14,27
IMBABURA	ItA1	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,22	1,3	13,17
	ItA2	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,16	1,22	12,13
	ItA3	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,18	1,4	14,01
	ItA4	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	2,86	1,02	9,18
	ItA5	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,08	1,32	12,79
	ItA6	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,17	1,31	13,06
	ItA7	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,27	1,25	12,86
	ItA8	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,16	1,17	11,63
	ItA9	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,175	1,35	13,48
	ItA10	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	2,9	1	9,12
PICHINCHA	PtA1	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,29	1,31	13,56
	PtA2	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,14	1,24	12,25
	PtA3	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,2	1,08	10,87
	PtA4	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,04	1,2	11,48
	PtA5	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,135	1,325	13,07
	PtA6	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,15	1,245	12,34
	PtA7	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,2	1,4	14,09
	PtA8	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,3	1,1	11,42
	PtA9	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,115	1,25	12,25
	PtA10	OVOIDE	AHUSADO	REDONDO	3,3	1,25	12,98
PROMEDIO AREA							12,28
D. ESTANDAR							1,44

Fuente: Alarcón, 2012

4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *COLLETOTRICHUM* SPP.

4.4.1 CUANTIFICACIÓN DE ADN DE *Colletotrichum* spp., AISLADO DE *L. Mutabilis* (chocho).

Los 9 aislamientos del patógeno provenientes de chocho, alcanzaron un promedio de 7,7 ng/μl según el marcador de 1kb. En comparación con el marcador low mass ladder las mismas muestras presentaron una concentración promedio de 16,11 ng/μl y de 4,3 ng/μl respecto a la cuantificación con Qubit (**Cuadro 4.11**).

Las muestras que alcanzaron una concentración mayor o igual a 10 ng/μl fueron consideradas para la amplificación por PCR.

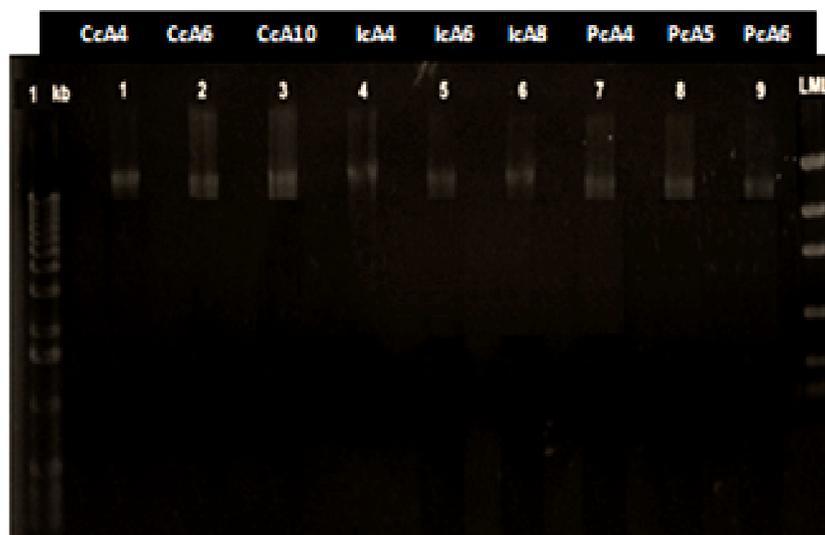


Figura. 4.1. Visualización de ADN de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de chocho (*L. mutabilis*) seleccionados por su tamaño (Alarcón, 2012).

Cuadro. 4.11. Concentración de ADN de 9 muestras.

CARRIL	AISLAMIENTO	FRAG (1kb)	FRAG (LML)	[ADN] (ng/μl)		
				1Kb	LML	QUBIT
1kb	Marcador	-----	-----	11	30	4,3
1	CcA4	1000bp	1200bp	2,7	10	4,2
2	CcA6	250bp	400bp	15,9	30	4,2
3	CcA10	1450bp	1200bp	8,8	20	4,8
4	IcA6	850bp	800bp	3,3	5	4,1
5	IcA4	300bp	200bp	11,6	20	4,6
6	IcA8	850bp	800bp	4,4	5	4,9
7	PcA5	400bp	200bp	7,1	20	3,8
8	PcA6	650bp	800bp	4,4	5	3,8
9	PcA9	200bp	200bp	7,7	16,1	4,3
LML	Marcador	-----	Promedio	7,7	16,1	4,3

Fuente: Alarcón, 2012

4.4.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN DE *Colletotrichum* spp., AISLADO DE *S. betacea* (tomate de árbol) POR ELECTROFORESIS

Los 9 aislamientos del patógeno provenientes de tomate de árbol, alcanzaron un promedio de 6,5 ng/μl según el marcador de 1kb. En comparación con el marcador low mass ladder las mismas muestras presentaron una concentración promedio de 11,1 ng/μl y de 5,64 ng/μl respecto a la cuantificación con Qubit (**Cuadro 4.12**).

Las muestras que alcanzaron una concentración mayor o igual a 10 ng/μl fueron consideradas para la amplificación por PCR.

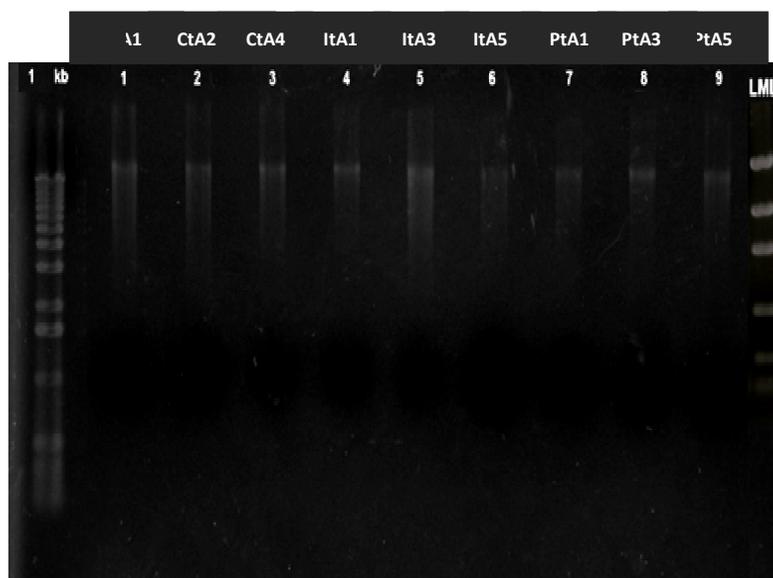


Figura. 4.2. Visualización de ADN de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de tomate de árbol (*S. betaceum*) seleccionados por su tamaño (Alarcón, 2012).

Cuadro. 4.12. Concentración de ADN de 9 muestras.

CARRIL	AISLAMIENTO	FRAG (1kb)	FRAG (LML)	[ADN] (ng/μl)		
				1kb	LML	QUIBIT
1	CtA1	300bp	200bp	3,3	5	4,8
2	CtA2	500bp	400bp	11	10	4,6
3	CtA4	500bp	400bp	11	10	5,6
4	ItA1	850bp	800bp	9,3	20	5
5	ItA3	400bp	400bp	4,4	10	5,3
6	ItA5	300bp	400bp	3,3	10	5,2
7	PtA1	400bp	400bp	4,4	10	5,3
8	PtA3	800bp	800bp	8,8	20	5,2
9	PtA5	300bp	200bp	3,3	5	5,1
LML	Marcador	-----	Promedio	6,5	11.1	5,64

Fuente: Alarcón, 2012

4.5 ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS PCR DE ADN DE *COLLETOTRICHUM SPP.*

El tamaño de los productos PCR del ADN del patógeno aislado en chocho se encontró entre los 400 a 500bp, siendo esta una concentración aproximada de 10 y 12,5 ng/μl (**Figura 4.3**). El tamaño de los productos PCR del ADN del patógeno aislado de tomate de árbol se encontró entre los 250 a 300bp, siendo esta una concentración aproximada de 6,25 a 7,5 ng/μl (**Figura 4.4**).

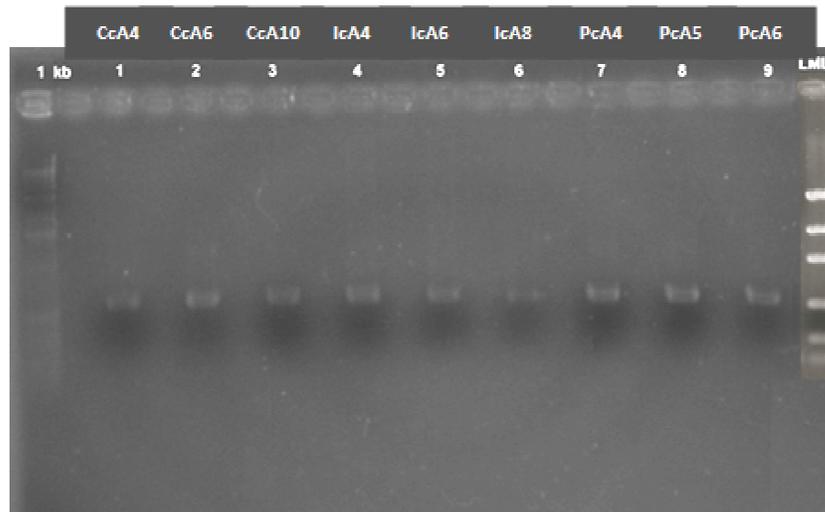


Figura. 4.3. Visualización de productos PCR de ADN de *Colletotrichum* spp. aislado de chocho (*L. mutabilis*) (Alarcón, 2012).

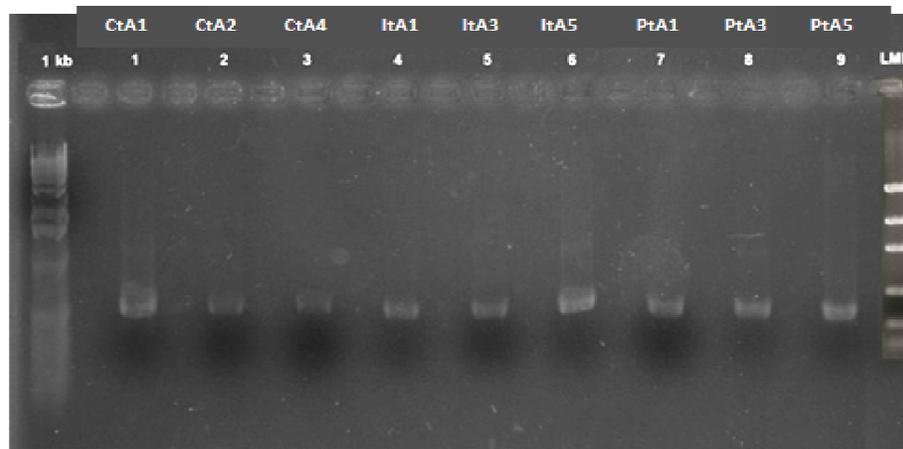


Figura. 4.4. Visualización de productos PCR de ADN de *Colletotrichum* spp., aislado de tomate de árbol (*S. Betaceum*) (Alarcón, 2012).

4.6 ANALISIS DE SECUENCIAS

4.6.1 ANALISIS DE SECUENCIAS ITS-1 CON EL PROGRAMA BLAST

Según el análisis en la interfaz web blast, todas las secuencias obtenidas de los aislamientos del patógeno resultaron ser *Colletotrichum acutatum* con un porcentaje de identidad máxima variable entre 99 y 100%, mientras que la cobertura de interés varía entre 92 - 96%.

Cuadro. 4.13. Análisis blast de las secuencias ITS1.

AISLAMIENTO	ACCESIÓN	DESCRIPCION	COBERTURA	E.VALUE	MAX
			ADN INTERES		IDENTIDAD
CcA4	*JN543069.1	Colletotrichum acutatum ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2	94%	0	99%
CcA6	AJ301968.1	Colletotrichum lupini 18S rRNA gene (partial)	95%	0	99%
CcA10	AJ301916.1	Colletotrichum lupini 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene	96%	0	99%
IcA6	JN943454.1	Colletotrichum lupini strain C1159.1	95%	0	99%
IcA4	FN566877.1	Glomerella acutata 18S rRNA gene (partial), ITS1	96%	0	99%
IcA8	EU008864.1	Glomerella acutata isolate M39 internal transcribed	94%	0	99%
PcA5	EU008864.1	Glomerella acutata 18S rRNA gene (partial), ITS1	95%	0	99%
PcA6	AJ301968.1	Colletotrichum lupini 18S rRNA gene	95%	0	99%
PcA9	*JN543070.1	Glomerella acutata isolate Tam7 internal transcribed space	95%	0	99%
CtA1	AF521210.1	Glomerella acutata isolate TOM-12 18S ribosomal RNA	92%	0	100%
CtA2	AF521210.1	Glomerella acutata isolate TOM-12 18S ribosomal RNA	95%	0	100%
CtA4	*JN543070.1	Glomerella acutata isolate Tam7 internal transcribed space	94%	0	100%
ItA1	*JN543070.1	Glomerella acutata isolate Tam7 internal transcribed space	96%	0	100%
ItA3	EU008878.1	Glomerella acutata isolate C2 internal transcribed spacer	93%	0	99%
ItA5	*JN543070.1	Glomerella acutata isolate Tam7 internal transcribed space	95%	0	100%
PtA1	*JN543066.1	Glomerella acutata isolate Lup28 internal transcribed space	96%	0	99%
PtA3	AF521210.1	Glomerella acutata isolate TOM-12 18S ribosomal RNA gen	93%	0	100%
PtA5	JN697574.1	Glomerella acutata isolate PIPA3 internal transcribed space	94%	0	99%

Fuente: Alarcón, 2012

4.6.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS ITS-1 CON EL PROGRAMA MEGA 5.0

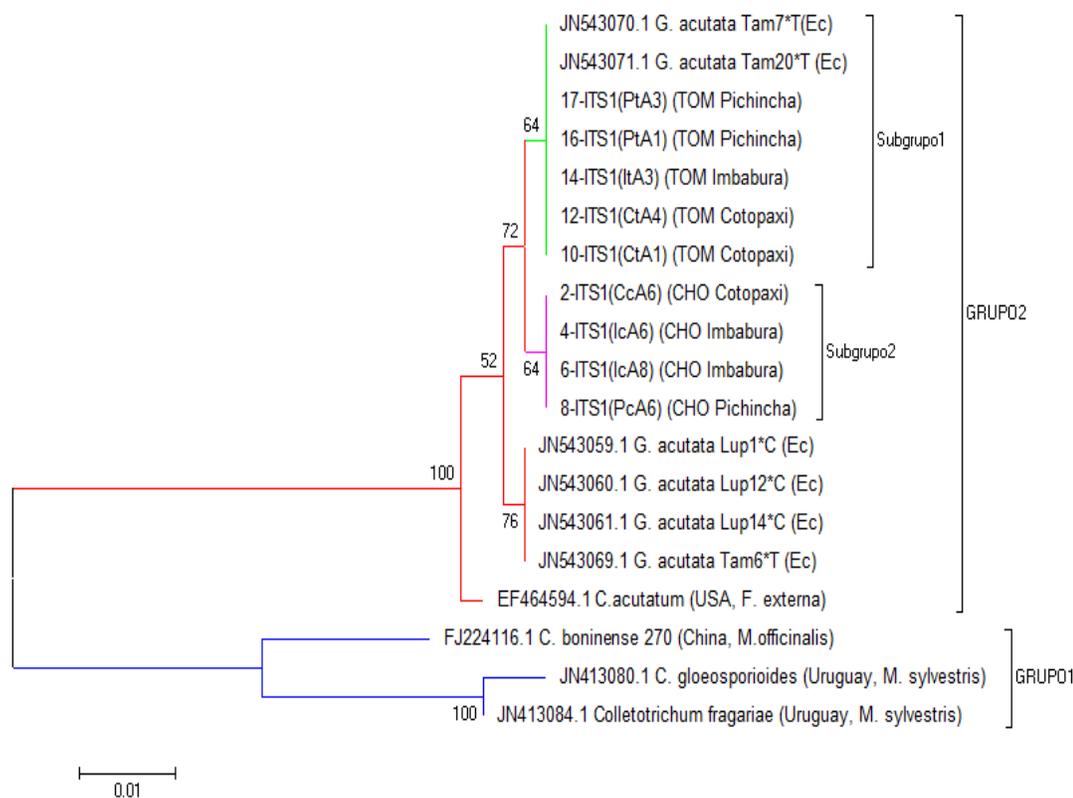


Figura. 4.5. Dendrograma de secuencias ITS1 pertenecientes a especies del género *Colletotrichum* (Alarcón, 2012).

Las secuencias completas aisladas de *Colletotrichum* de chocho y tomate de árbol alcanzaron un promedio 596 nucleótidos. Se encontraron 478 (79.5%) sitios conservados y 96 (15,9%) sitios variables, de los cuales 54 fueron parsimoniosos informativos (8,9%), es decir que muestran la mayor variabilidad dentro de las secuencias comparadas.

El dendrograma para los organismos del género *Colletotrichum* se subdivide en dos grupos, el más pequeño resultó ser más distante porque se encuentra aislado del grupo 2, debido a la divergencia en las distancias genéticas (**Figura 4.6**). El grupo 2 está formado por siete secuencias registradas en el genbank y nueve secuencias ITS1 de

aislamientos colectados en Chocho y tomate de árbol. Las secuencias aisladas del tomate de árbol de las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura se encuentran anidadas en el sub grupo 1 y comparten caracteres con las secuencias JN543070.1 *G. acutata* Tam7*T y JN543071.1 *G. acutata* Tam20*T colectadas en la zona andina Ecuatoriana (Falconí, 2012).

En cuanto a las secuencias de chocho se concentran en el subgrupo 2 aisladas de las muestras de tomate. Presentaron la misma topología con una frecuencia del 92% bajo un análisis de 1000 replicas. En comparación con el sub grupo 1 resultaron tener un 26% de similitud. Ambos grupos presentaron un 100% de similitud con la secuencia EF464594.1 *Colletotrichum acutatum*, colectada en escama blanca en Estados Unidos.

La anidación de las muestras en el subgrupo determina las distancias y la variabilidad genética entre especies a través de la matriz de distancias genéticas (**figura 4.6**).

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. 2-ITS1(CcA6)								
2. 4-ITS1(IcA6)	0.004							
3. 6-ITS1(IcA8)	0.002	0.004						
4. 8-ITS1(PcA6)	0.004	0.000	0.004					
5. 10-ITS1(CtA1)	0.005	0.005	0.007	0.005				
6. 12-ITS1(CtA4)	0.005	0.005	0.005	0.005	0.004			
7. 14-ITS1(IItA3)	0.007	0.004	0.007	0.004	0.002	0.002		
8. 16-ITS1(PtA1)	0.005	0.007	0.004	0.007	0.004	0.002	0.004	
9. 17-ITS1(PtA3)	0.009	0.009	0.009	0.009	0.007	0.004	0.005	0.005

Figura. 4.6. Matriz de distancias genéticas de las secuencias analizadas

4.7 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

4.7.1 ANALISIS DE VARIANZA DE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN PLANTAS DE *L. mutabilis* (chocho) INOCULADAS CON *C. acutatum* AISLADO DEL MISMO HOSPEDERO.

Se seleccionó al azar tres cepas (una de cada provincia) para infectar plantas de chocho con *C. acutatum*. aislado de *L. mutabilis*, las cepas fueron PcA5, IcA4 y CcA2.

Cuadro. 4.14. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en plantas de *L. mutabilis* inoculadas con *C. acutatum* del mismo hospedero.

F.D. V	GL	S. C	C.M	F.C	F.T
Entre U.E	8	58,89	7,36		
Tratamientos	2	3,39	1,69	0,52	3,46
Error exp.	6	19,50	3,25		
Error. muestr	27	36	1,33		
TOTAL	35				

Fuente: Alarcón, 2012

En este caso, el F tabulado (5%) con una confiabilidad del 95%, es mayor al F. calculado ($3,46 > 0,52$), por lo que se acepta la hipótesis nula, indicando que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, por la tanto los tres aislamientos presentaron un mismo nivel de virulencia (**Anexo 4**).

4.7.2 ANALISIS DE VARIANZA DE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN PLANTAS DE *L. mutabilis* (chocho) INOCULADAS CON *C. acutatum* AISLADO DE *S. betacea* (tomate de árbol).

Se seleccionó al azar tres cepas (una de cada provincia) para infectar plantas de chocho con *C. acutatum*. aislado de *S. betaceum*, las cepas fueron PtA3, CtA7, ItA1.

Cuadro. 4.15. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en plantas de *L. mutabilis* inoculadas con *C. acutatum* de *S. betaceum*.

F. D.V	G.L	S. C	C.M	F.C	F.T
Entre U.E	8	41,00	5,13		
Tratamientos	2	17,17	8,58	18,18	3,46
Error exp.	6	2,83	0,47		
Error muestreo	27	21	0,78		
TOTAL	35				

Fuente: Alarcón, 2012

En este caso, el F. Calculado fue mayor al de F tabulado (5%) con una confiabilidad del 95%, (18,18 >3,46), por lo que se acepta la hipótesis alternativa señalando que los tratamientos fueron distintos, indicando que la diferencia fue altamente significativa, siendo la cepa PtA3 la más virulenta debido que su sumatoria total fue de 59 (**Anexo 5**).

4.7.3 ANALISIS DE VARIANZA DE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN PLANTAS DE *S. betacea* (tomate de árbol) INOCULADAS CON *C. acutatum* AISLADO DE *L. mutabilis* (chocho).

Se seleccionó al azar tres cepas (una de cada provincia) para infectar plantas de tomate de árbol con *Colletotrichum* spp. aislado de *Lupinus mutabilis*, las cepas fueron PcA5, IcA4 y CCA2.

Cuadro. 4.16. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en plantas de *S. betaceum* inoculadas con *C. acutatum* de *L. mutabilis*.

FDV	GL	S. C	C.M	F.C	F.T
Entre U.E	8	26,75	3,34		
Tratamientos	2	4,17	2,08	6,82	3,46
Error exp.	6	1,83	0,31		
Error muestreo	27	21	0,77		
TOTAL	35				

Fuente: Alarcón, 2012

En este caso, el F. Calculado es mayor al F tabulado (5%) con una confiabilidad del 95%, (6,82 >3,46), por lo que se acepta la hipótesis alternativa que indica que los tratamientos nos fueron iguales, mostrando diferencia altamente significativa, la cepa PcA5 fue la más virulenta, y su sumatoria total fue 34 (**Anexo 6**).

4.7.4 ANALISIS DE VARIANZA DE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS EN PLANTAS DE *S. betacea* (tomate de árbol) INOCULADAS CON *C. acutatum* AISLADO DEL MISMO HOSPEDERO.

Se seleccionó al azar tres cepas (una de cada provincia) para infectar plantas de tomate de árbol con *C.acutatum*. aislado de *L. mutabilis*, las cepas fueron PtA3,CtA7, ItA1.

Cuadro. 4.1. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en plantas de *S. betaceum* inoculadas con *C. acutatum* del mismo hospedero.

FDV	GL	S. C	C.M	F.C	F.T
Entre U.E	8	68	8,5		
Tratamientos	2	45,5	22,7	10,5	3,4
Error exp.	6	13	2,1		
Error muestreo	27	10	0,3		
TOTAL	35				

Fuente: Alarcón, 2012

En este caso, el F. Calculado es mayor al F tabulado (5%) con una confiabilidad del 95%, ($10,50 > 3,46$), por lo que nos indica que se acepta la hipótesis alternativa que indica que los tratamientos no fueron iguales, y la diferencia de éstos es altamente significativa, por lo tanto la cepa más virulenta resultó ItA1, ya que su sumatoria total fue 63 (**Anexo 7**).

CAPITULO V

DISCUSIÓN

Después de haber aislado y cultivado monosporicamente *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.

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 $12,8\mu\text{m}^2$. En aislamientos de *Solanum betaceum* el área promedio resultó ser de $12,2\mu\text{m}^2$. 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*.

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).

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).

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 4.5**, 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. gloeosporoides* 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. gloeosporoides*.

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).

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*.

CAPITULO VI

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.

CAPITULO VII

RECOMENDACIONES

Hacer un estudio detallado sobre la morfología macroscópica, ciclo de vida, signos y síntomas que provoca el patógeno *C. acutatum*. en tejidos vegetales.

Realizar la extracción de ADN de aislamientos puros y jóvenes para obtener ADN de buena calidad y cantidad.

Es necesario que el Agricultor se informe adecuadamente acerca de la antracnosis y su agente causal. El agricultor debe pedir ayuda a expertos para que puedan determinar molecularmente la especie del patógeno que ataca a sus cultivos, para que pueda controlar la plaga usando el agroquímico adecuado.

El agricultor debe localizar los sembríos de chocho y tomate de árbol completamente separados o realizar una rotación de cultivo adecuada, para que no se vean afectados por cualquier especie del género *Colletotrichum* spp. y se causen infecciones cruzadas.

CAPITULO VIII

RESUMEN

La antracnosis en el Ecuador ha causado varias pérdidas económicas especialmente a nivel post cosecha, razón por la cual se realizó el presente trabajo, que 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 encontró características propias de éste género en el color de las colonias que varían de tonos entre anaranjado con mezcla de gris y verde, y otras tonalidades que llegan hasta un color salmón. 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.

CAPITULO IX

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.

CAPITULO X

BIBLIOGRAFÍA

Abang, M., Winter, S., Mignouna H., Green, K., y Asiedu R. 2002. Molecular Taxonomic, epidemiological and population genetics approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology* 2(12), pp. 486 – 496.

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.

Agrios, G. 2005. Plant Patology. 5th Edition. Academic Press. New York. USA. 922 p.

Atkins, S & Clark, I. 2004. Fungal Molecular Diagnostics: A mini review. *Journal of applied genetics*. 45(1), pp 3-15.

ASOCAM. (en línea) 1997, Estudios de Leguminosas 2, consultado el 18 de septiembre del 2010. Disponible en:

http://www.asocam.org/biblioteca/ECES_Estudios_Leguminosas_2.pdf

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

Bailey, J., O'Connell R., Pring R., y Nash C. 1992. Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. in: Bailey J.A.; Jeger M.J. (Ed). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control.* CAB Internacional., pp 88-98, 107-109.

- Barnett, H. L. 1998, Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Cuarta edición. The American Phytopathological Society . pp. 188-189.
- 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.
- Botero, M. 1999. “Estudios Biológico y Epidemiológicos de la Antracnosis (Colletotrichum gloesporioides Penz) en Tomate de Arbol y Desarrollo de Alternativos para su manejo integrado en Colombia”. Financiado por Pronatta., pp 15-18.
- Blanco, O. 1982. Genetic variability of tarwi (Lupinus mutabilis Sweet). En Agricultural and Nutritional Aspects of Lupines (eds., R. Gross y E.S. Bunting), GTZ, Eeschborn, pág. 33-49.
- Blanchard, G., Campbell, C., Lucas, L., 1992 Introduction to plant diseases: identification and management . Kluwer Academic Publishers, Second Edition. Masachussetts, Estados Unidos.
- Bridge, P.D, Couteaudier, Y. y Clarkson, J.M. 1998. Molecular Variability of fungal pathogens. CABI International. Wallingford. United Kingdom. 319 p.
- Burrell, M. 1993. Enzymes of Molecular Biology. Humana Pres inc. Totowa New Jersey. United States of América. 372 p.
- Caicedo, C. y Peralta, E. 2000. Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento artesanal de chocho (Lupinus mutabilis) en Ecuador, Boletín técnico No 89. INIAP-PRONALEG. Quito-Ecuador.
- CIMMYT, 2006. Protocolos de laboratorio, Laboratorio de genética molecular aplicada. Tercera Edición., Mexico.
- Campos, H. 1995. Marcadores moleculares: conceptos. Agro Sur (Chile) 23(1): 68-75.

Campos, H. y Salvo, H. 1995. Marcadores Moleculares: aplicaciones al mejoramiento genético de plantas. Agro Sur (Chile) 23(2): 173-185.

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.

Dauch, A., Watson, A. y Jabaji-Hare, S. 2003. Detection of the biocontrol agent Colletotrichum coccodes (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. Journal of Microbiological Methods 55: 51-64.

Dirección de Planificación, GPP. Mapa de la Provincia de Pichincha- Ecuador (en línea) (2005). Consultado el 16 de septiembre del 2010. Disponible en:
http://www.zonu.com/ecuador_mapas/Mapa_Provincia_Pichincha_Ecuador.htm

Dirección de Planificación, GPP. Mapa de la Provincia de Cotopaxi- Ecuador (en línea) (2005). Consultado el 16 de septiembre del 2010. Disponible en:
http://www.zonu.com/ecuador_mapas/Mapa_Provincia_Cotopaxi_Ecuador.htm

Dirección de Planificación, GPP. Mapa de la Provincia de Imbabura- Ecuador (en línea) (2005). Consultado el 16 de septiembre del 2010. Disponible en:
http://www.zonu.com/ecuador_mapas/Mapa_Provincia_Imbabura_Ecuador.htm

Dodd, J., Estrada, A., Jeffries, P., Bugante, R. y Jegger M. 1989. The use of epidemiological studies of Colletotrichum Gloesporoides to assess the effectiveness of pre and post harvest application of fungicides in control of Mango anthracnose. Filipinas.

Dodd, J., Estrada, A., Matcham, J., Jeffries, P. y Jegger M. 1991. The effect of climatic factors on Colletotrichum Gloesporoides, casual agent of Mango anthracnose. Filipinas.

- E.Z.N.A . Fungal DNA Kit., 2007. Handbook. Estados Unidos .
- 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 antracnose resistance. Ph.D. Thesis, Wogenningen University, 146 p.
- FAO. 1986. Informe final – Reunión sobre cultivos andinos subexplotados de valor nutricional., pág.27.
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1995. Introducao ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasilia, Embraba.
- 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.
- Geoff, T. 2003. Lupin anthracnose-identification and management. Department of Agriculture Farmnote., Plant Pathologist. 2, 3 p.
- Gil, V., Castro, C. y Cadena, G. 2003. El estudio de las Enfermedades del Cafeto en Colombia Chinchiná.
- Gross, R., Von Baer, F., Koch, R., Marquard, L., Trugo y M. Wink. 1988. Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (Lupinus mutabilis cv. Inti) with low alkaloid content. J. Food Comp. Anual. 1, 353-361.
- Gross, R. 1982. Fitomejoramiento in: El cultivo y la utilizacion del tarwi Lupinus mutabilis Sweet. Estudio FAO: Producción y proteccion vegetal. pp 90, 91.
- Hashagen, W. y Von Baer, E. 1996. ¿cómo convivir con la antracnosis?. in: avances de investigación en lupino. temuco, chile. instituto de investigaciones agropecuarias. centro regional de investigación carillanca. 222 p.

Hondelmann, W. 1984. The Lupin . An ancient and modern crop plant. Theor. Appl. Genet. **68**: pp 1-9.

Holliday, P. 1995. Fungus diseases of tropical crops. Dover Publications, Inc. Nueva York, Estados Unidos.

Horton, T. 2002. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil* 244: 29–39 (On line). <<http://www.esf.edu/efb/horton/horton2002.pdf>> (27 sept. 2011).

Jacobsen, S. y Sherwood, S. 2002 (en línea). Cultivos de granos andinos en Ecuador. Ecuador.CIP y FAO. Consultado 18 de septiembre del 2010. Disponible en: http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro10/cap03_1_3.htm

Junovich, A. 2003 (en línea). El cultivo del chocho a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario. Proyecto SICA – Banco Mundial. Consultado el 15 de septiembre del 2010 Disponible en: <http://www.sica.gov.ec/censo/contenido/chocho.pdf>

Lara, S. 2002 Memorias del Ñaupá Quito, Quito (en línea), consultado el 15 de septiembre del 2010 Disponible en : <http://www.edufuturo.com/educacion.php?c=1417>

León, J. 2004. Manual del Cultivo de Tomate de árbol. Iniap-Promsa. Quito-Ecuador., pp 2, 34.

Lewin. B, 2004. Genes VIII. Eighth Edition .Pearson Prentice Hall. New York, USA, 1027

Martínez-Culebras, P.; Barrio, E.; García, M.D. and Querol, A. 2000. Identification of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. En: *FEMS Microbiology Letters* 189: 97-101.

Mendgen, K. y Hanh, M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. Estados Unidos.

Ministerio de agricultura MAG, La agroindustria en el Ecuador (en línea). 2006, consultado el 16 de septiembre de 2010. Disponible en:

<http://passthrough.fwnotify.net/download/803650/http://www.iica.int/Esp/organizacion/LTGC/agroindustria/Documentos%20Agroindustria%20Rural/La%20agroindustria%20en%20el%20Ecuador.%20Un%20diagn%3Astico%20integral.pdf>

Munsell, E. 1994. Color Charts Handbook. Ed. Munsell Color Company Inc. New Winsor, NY USA.

National Center for Biotechnology Information. NBCI (en línea), consultado el 30 de septiembre del 2010, disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nicholson, R.L., y Moraes, W.B.C. 1980. Survival of Colletotrichum Graminicola: Importance of the spore matrix. *Phytopathology* 70: 225-271.

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).

Qubit Instruction Manual,2009, Qubit Fluorometer, Invitrogen. Estados Unidos.

Quintero, J. Apodaca, M. Loreda, J. Fierro, D. 2008. Manual de prácticas de micología, Departamento de parasitología Rama Fitopatología, Sinaloa, Mexico pp.8

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 arábica L.) e comportamento de isolados de Colletotrichum spp. Em plantas obtidas por cultura de embrião. Tesis de Maestría en Agronomía com Emfasis 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.

Sinclair, B. 1991 Latent infections on soybean plants and seeds by fungi plant disease. Estados Unidos.

Sutton, B. 1992. The genus Glomerella and its anamorph Colletotrichum. Biology, Pathology and control CAB international. Wallingford, pp. 1-26.

- Swinburne, T. 1983. Quiescent infections in post Harvest diseases. Londres, Inglaterra.
- Ulloa, M. y Hanlin, T. 2001. Ilustrated 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.
- Verhoeff, K. 1974. Latent infections by Fungy. Estados Unidos.
- 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.
- Yuan, J., Reed, A., Chen, F. y Stewart, C. 2006. Statistical Analysis of real time PCR data. BCM. Bioinformatics 7:85.
- Yang, H. y Sweetingham, M. 1998. The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupin anthracnose. Agric.Res. 49: 1213-1223.
- White, T., Burns, T., Lee, S. y Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA, genes for Phylogenetics. In: PCR protocols : A guide of method and amplificatio. Academic Press New York.
- Whatton, P. y Uribeondo, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del Jardín Botánico. Madrid, España.

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>