

# Caracterización morfológica y molecular del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol en Azuay y Loja

## Morphological and molecular characterization of the causal agent of anthracnose in tree tomato in Azuay and Loja

Castro-Quezada Patricio<sup>1\*</sup>  
Bravo-Zúñiga Catalina<sup>2\*</sup>  
Cabrera-Cabrera Aníbal<sup>1</sup>  
Quillay-Curay Norma<sup>2</sup>  
Ramón-Montoya María<sup>1</sup>  
Belesaca-Morocho Iván<sup>1</sup>  
Díaz-Granda Lourdes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental del Austro. Laboratorio de Protección Vegetal, km 12 1/2 Vía a El Descanso - Gualaceo sector Bullcay, Provincia Azuay, Cantón Gualaceo, Ecuador

\*Autor para correspondencia: patricio.castro@ucuenca.edu.ec

Recibido: 26/02/2019

Aprobado: 14/05/2019

### RESUMEN

La antracnosis es una enfermedad fúngica que causa graves pérdidas en el cultivo de tomate de árbol en el Ecuador. La enfermedad causa graves daño en los frutos y su control se basa principalmente en la utilización de productos químicos. A nivel del Ecuador se ha reportado como causantes de la antracnosis a los géneros *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en base a características morfológicas. En el presente estudio se realizó la caracterización morfológica y molecular de 16 aislados de *Colletotrichum* spp. de tomate de árbol, en seis localidades diferentes en las provincias de Azuay y Loja. La caracterización morfológica se la hizo para variables tales como color de la colonia y forma del conidio, mientras que la caracterización molecular se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se realizó con primers específicos reportados para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, diseñados en el espaciador de transcripción interna (ITS). En base a la caracterización morfológica y molecular se determinó que el agente causal de la antracnosis para las provincias de Azuay y Loja es el complejo de *C. acutatum*, representado por *C. tamarilloi*. Los aislados presentaron las características propias de la especie y los análisis moleculares permitieron confirmar este resultado, generando amplificaciones de pesos moleculares de aproximadamente 500 pb, mientras que con los primers específicos de *C. gloeosporioides* no se obtuvo ninguna amplificación. Esta caracterización molecular confirma los resultados que ubican al complejo de *C. acutatum* como agente causal de la antracnosis en el Austro del Ecuador.

**Palabras clave:** Internal transcribed spacer, ojo de pollo, caracterización molecular, caracterización morfológica.

## ABSTRACT

**A**nthrachnose is a fungal disease that causes serious losses in tree tomatoes in Ecuador. This disease causes serious damage to fruits and its control is based mainly on use of chemical products. In Ecuador, the genera *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* have been reported to be the causal agent of anthracnose, based on morphological characteristics. In this study, the morphological and molecular characterization of 16 isolates of *Colletotrichum* spp. of tree tomato, in six different localities in the provinces of Azuay and Loja. Morphological characterization was carried out for variables such as colony color and conidium shape, while molecular characterization was performed by polymerase chain reaction (PCR). PCR experiments was carried out with specific primers reported for *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*, designed in the internal transcription spacer (ITS). Based on morphological and molecular characterization, it was determined that the causative agent of anthracnose for the provinces of Azuay and Loja is the *C. acutatum* complex, represented by *C. tamarilloi*. Isolates presented characteristics of this species and molecular analysis allowed to confirm this result, generating amplifications of molecular weights of approximately 500 bp, while with the specific primers of *C. gloeosporioides* no amplification was obtained. This molecular characterization confirms results that place the *C. acutatum* complex as the causative agent of anthracnose in the Southern region of Ecuador.

*Keywords:* Internal transcribed spacer, chicken eye, tree tomato, molecular characterization, morphological characterization.

## INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol, *Solanum betaceum* Cav., es una fruta andina con amplias perspectivas de desarrollo y cuya caracterización morfológica y molecular ha situado a Ecuador como uno de los centros de diversidad. El cultivo tiene un gran potencial para su comercialización por sus excelentes características organolépticas (Acosta-Quezada *et al.*, 2011). Sin embargo, entre los numerosos problemas fitosanitarios del cultivo tenemos la antracnosis de los frutos causado por el hongo *Colletotrichum* spp, el cual está ampliamente distribuida en las zonas productoras de tomate de árbol (Lobo *et al.*, 2011).

Los síntomas de esta enfermedad pueden presentarse en los frutos, tallos y ramas en sus diferentes estados fenológicos de desarrollo. La mayor incidencia de la enfermedad se presenta en épocas lluviosas y con temperaturas promedio entre 13 a 15°C y una humedad ambiental del 95%. Las lesiones se presentan de color oscuro y varían en tamaño y forma. En los frutos las lesiones son negras, deprimidas y acompañadas de masas de conidios de color rosa (Falconí *et al.*, 2013). En Ecuador, las pérdidas en el rendimiento debido a la antracnosis pueden variar en un rango comprendido entre 60 y 80% (Santillán, 2001). Los métodos de control que se utilizan actualmente comprenden la aplicación de agroquímicos, remoción de frutos enfermos y control cultural (Lobo *et al.*, 2011).

La identificación de especies de *Colletotrichum* se ha basado principalmente en la morfología y el rango de huéspedes (Cannon *et al.*, 2012). Sin embargo, estas características son a menudo poco confiables para determinar adecuadamente la especie a la que corresponde un aislado (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996). Como ejemplo, dentro del género *Colletotrichum*, la especie *C. acutatum* puede ser o no

patógena (Sreenivasaprasad y Talhinhos, 2005), mientras que *C. acutatum*, *C. asianum*, *C. boninense*, *C. tamarilloi* y *C. theobromicola* no son específicos y pueden crecer en diferentes huéspedes (Cabrera et al., 2018).

A nivel morfológico algunos estudios realizados han señalado a *C. acutatum* como el hongo responsable de la antracnosis en Ecuador (Viera et al., 2016) y Colombia (Afanador-Kafuri et al., 2003; Saldarriaga et al., 2008;). Sin embargo, otros estudios señalan a *C. gloeosporioides* como el agente causal de la antracnosis en Ecuador y Colombia (Rueda et al., 2005; Alarcón y Chavarriaga, 2007; Lobo et al., 2011; Obando 2012; Santander et al., 2014; Feicán et al. 2016).

A nivel molecular, estudios basados en la secuencia de la región espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico (ADNr) en Colombia mostraron que la antracnosis en tomate de árbol es causada por *C. acutatum* y no por *C. gloeosporioides* (Afanador-Kafuri et al., 2003). Sin embargo, Pardo et al. (2016) demostraron por marcadores moleculares definidos en el ITS y el gen glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), que las especies de los grupos *C. acutatum*, *C. boninense* y *C. gloeosporioides* están asociados a cultivos de tomate de árbol y mango.

En Ecuador, los estudios de Falconí et al. (2013) a nivel morfológico y molecular señalan como responsable a *C. acutatum*, en un estudio realizado en tres provincias del Ecuador (Pichincha, Cotopaxi e Imbabura). Caicedo et al., (2017) realizaron un estudio en la Región Interandina y señalan como responsable a *C. tamarilloi*, especie que ha sido definida dentro del complejo de *C. acutatum*, pero su estudio solo incluyó tres muestras de las provincias de Azuay y Loja.

El objetivo del presente estudio fue confirmar al complejo *C. acutatum* como el agente causal de la antracnosis en 16 localidades frutícolas de tomate de árbol en las provincias de Azuay y Loja, a partir de características morfológicas y moleculares (secuencia de ITS).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y aislamiento de *Colletotrichum*

La colecta de muestras se realizó en 16 zonas frutícolas de tomate de árbol, en las provincias de Azuay (12 muestras) y Loja (4 muestras) durante el año 2016, en huertos que presentaron síntomas comunes de antracnosis como lesiones negras en los frutos, acompañados de masas de conidios de coloración rosada (Fig. 1). Se tomaron muestras de frutos y se asignó un código a cada muestra (Tabla 1).

Los frutos infectados se cortaron en trozos de 5 mm con un bisturí estéril alrededor de lesiones jóvenes pequeñas (2,5 mm de lesión y 2,5 mm de tejido sano). Los pedazos de tejido fueron esterilizados superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% durante 1,5 minutos y luego fueron enjuagados por tres ocasiones con agua estéril. Se retiraron los bordes de cada pedazo para obtener porciones más pequeñas. Luego fueron sembrada en caja de Petri con medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar TM MEDIA 344). Los aislados que crecieron, se purificaron con subcultivos en cajas Petri. Se realizaron cultivos monospóricos de cada aislado, utilizando la metodología de Nelson et al. (1983).



Figura 1. Lesiones comunes de antracnosis observadas en frutos de tomate de árbol. Las muestras fueron recolectadas en El Pan (provincia de Azuay).

**Tabla 1.** Códigos y ubicación de los aislados de *Colletotrichum* spp. recolectados en las provincias de Azuay y Loja.

Código	Localización (Sector-Provincia)	Tejido afectado	Coordenadas UTM
UC001	Bulán, Azuay	Frutos, hojas	668643 - 9627984
UC002	Bulan, Azuay	Frutos, hojas	669668 - 9628959
UC003	Bulan, Azuay	Frutos, hojas	669848 - 9630259
UC004	El Pan, Azuay	Frutos, hojas	670393 - 9629800
UC005	El Pan, Azuay	Frutos, hojas	668675 - 9627293
UC006	El Pan, Azuay	Frutos, hojas	670091 - 9628676
UC007	Donjulo, Azuay	Frutos, hojas	670648 - 9628863
UC008	Donjulo, Azuay	Frutos, hojas	670548 - 9627837
UC012	Donjulo, Azuay	Frutos, hojas	673363 - 9628443
UC013	Donjulo, Azuay	Frutos, hojas	677929 - 9626685
UC013b	Sevilla de oro, Azuay	Frutos, tallos	753442 - 9710649
UC014	Gauchapala, Azuay	Frutos, hojas	750130 - 9686580
UC015b	San Pablo de Tenta, Loja	Frutos, tallos	719491 - 9676999
UC016	San Pablo de Tenta, Loja	Frutos, hojas	689660 - 9601679
UC019	Saraguro, Loja	Frutos, hojas	686689 - 9599501
UC022	Las Lagunas, Loja	Frutos, tallos	695742 - 9597566

### **Caracterización morfológica**

Para cada aislado obtenido de los cultivos monospóricos se tomó asépticamente secciones de 4 mm en las áreas de esporulación activa cerca del borde de crecimiento y se sembró en cajas Petri con medio PDA (cuatro repeticiones). Los aislados fueron incubados en cámara de clima constante MEMMERT a  $\pm 25$  °C y  $\pm 75\%$  de humedad relativa durante 7 días. La caracterización del micelio se realizó mediante observación directa de cada aislado y se registró el tipo de micelio, la presencia, ausencia y el tipo (escaso o algodonoso), coloración de la colonia y se realizaron mediciones diarias para determinar la tasa de crecimiento hasta los 10 días luego de la siembra en mm por día; de acuerdo a la metodología de Nelson *et al.* (1983) modificada.

#### *Caracterización de conidios*

Para la producción de conidios, los aislados se sembraron en medio de cultivo PDA y para favorecer la esporulación se colocaron los aislados a los 5 días de siembra bajo un fotoperiodo de 8 h con luz fluorescente (tubo General Electric Staybright XL, F40SXL SP35 40 W). Se tomó una sección de cada aislado, se colocó en un portaobjetos cuadrado con una gota de lactofenol y se observó en un microscopio óptico Olympus Bx 41 la forma de 10 conidios por caja (40 en total). Las estructuras en cada placa se fotografiaron con cámara digital (Canon Powershot ELPH 500 HS) adaptada al lente del microscopio. Los conidios se clasificaron según su forma en tres categorías, 0= conidios con los dos extremos redondeados, 1= conidios con un extremo redondeado y otro agudo (mixtas), 2= conidios con los dos extremos agudos.

### **Pruebas de patogenicidad**

La patogenicidad de los aislamientos obtenidos se verificó en frutos de tomate de árbol. Los frutos se obtuvieron en estado de madurez fisiológica, y se esterilizaron superficialmente mediante inmersión en etanol (tres minutos), hipoclorito de sodio al 1 % (cinco minutos), y agua destilada estéril (tres veces durante dos minutos cada vez). A continuación, se secaron en cámara de flujo laminar. Los frutos se inocularon mediante el método de inoculación por herida y goteo depositando 6  $\mu$ L de la suspensión conidial ( $\sim 1 \times 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup>) sobre el área de la herida previamente demarcada (Than *et al.*, 2008).

Como control, se inoculó agua destilada estéril. Los frutos inoculados se colocaron en cámaras húmedas en condiciones estériles (humedad relativa cercana al 95 %) (Montri *et al.*, 2009), a temperatura ambiente ( $\pm 24$ °C), y sometidos a regímenes normales de luz durante siete días (Than *et al.*, 2008). Por cada interacción entre aislamiento y hospedante se emplearon tres repeticiones. Siete días después de la inoculación se evaluaron los síntomas de la enfermedad y se tomaron fragmentos del borde de las lesiones o del área inoculada (en caso de no observar síntomas). El organismo aislado se cultivó en medio PDA y los caracteres de la colonia y su morfología se compararon con el cultivo inicialmente inoculado.

### **Caracterización molecular**

El ADN se extrajo del micelio del hongo obtenido de cultivos puros en medio PDA. Para cada aislado se utilizó aproximadamente 100 mg de micelio de acuerdo a la metodología de Fulton *et al.* (1995). La concentración del ADN para cada aislado se midió en un espectrofotómetro (EPOCH) y se diluyó hasta una concentración final de 50 ng/ $\mu$ l para la amplificación por reac-

ción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se realizó con los primers específicos de cada taxón: para *C. acutatum* se utilizó el primer ITS4 (White *et al.*, 1990) con el primer específico CaInt2 (GGGAAGCCTCTCGCGG) (Brown *et al.*, 1996, Sreenivasaprasad *et al.*, 1996). Para *C. gloeosporioides* se utilizó el primer ITS4 (White *et al.*, 1990) con el primer específico (CgInt) (GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG) (Brown *et al.*, 1996).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler NexusGSX1, en un volumen final de 25  $\mu$ l, con 50 ng de ADN, 2,5 mM de dNTP (cada uno), 0,25 mM de cada primer, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1 U de ADN polimerasa (Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizarán durante 30 ciclos (30 s a 95 ° C, 30 s a 60 ° C y 1,5 min a 72 ° C). Los productos de la amplificación se separaron en geles de agarosa al 1% a 100 V durante 30 minutos. Un marcador molecular de 1 kpb (Invitrogen) se utilizó como estándar molecular.

## ■ RESULTADOS

### Recolección y aislamiento del hongo

Se obtuvieron 16 aislados monospóricos de *Colletotrichum* spp., tomados de huertos de tomate de árbol en las provincias de Azuay y Loja. Los aislados causaron síntomas típicos de antracnosis en los frutos de tomate de árbol inoculados. En base a los síntomas se aisló nuevamente el patógeno y sus características morfológicas resultaron similares al originalmente inoculado, con lo que se cumplieron los postulados de Koch.

### Caracterización morfológica

#### *Características de la colonia*

Los aislados en medio PDA presentaron diferente morfología en cuanto al color. En general el color de la colonia de los aislados cambió de tonalidades claras a oscuras con el paso de los días. Se observó colores que van desde blanco a amarillo en la superficie superior, y desde naranja a violeta en la inferior (Figura 2).

Estas coloraciones de tonalidades claras son asociadas con *C. acutatum* y para la mayoría de aislados la morfología de la colonia (superficie superior e inferior) fue consistente con descripciones publicadas para las especies del complejo *C. acutatum*. (Than *et al.*, 2008; Falconí *et al.*, 2013; Caicedo *et al.*, 2017).

El crecimiento de los diferentes aislados fue regular y progresivo en medio PDA y después de 10 días a  $\pm$  25°C, la caja Petri estuvo casi completamente recubierta por los aislados.

Siete de los 16 aislados presentaron un micelio algodonoso y denso en el centro, mientras el resto presentaron un micelio escaso. Se registró la formación de micelio aéreo de tipo escaso-liso en un 60% de las colonias y 40% de tipo abundante- algodonoso (Tabla 2, Figura 2).



**Tabla 2.** Caracterización morfológica y tipo de conidios de aislados de *Colletotrichum* spp. de tomate de árbol en las provincias de Azuay y Loja.

Código	Crecimiento	Tipo de micelio	Coloración superficie inferior	Coloración superficie inferior	Forma Conidios
UC001	4,90 RL	Escaso	Blanco	Amarillo	2
UC002	5,21 RL	Algodonoso	Crema	Marrón	1
UC003	4,88 RL	Escaso	Crema	Marrón	2
UC004	5,15 RL	Escaso	Crema	Marrón	1
UC005	5,05 RL	Algodonoso	Crema	Marrón	2
UC006	5,21 RL	Escaso	Crema	Violeta	1
UC007	7,00 ML	Escaso	Amarillo	Marrón	1
UC008	6,30 RL	Algodonoso	Crema	Marrón	2
UC012	7,48 R	Algodonoso	Blanco	Marrón	2
UC013	8,50 R	Algodonoso	Crema	Naranja	2
UC013b	8,00 R	Algodonoso	Crema	Violeta	1
UC014	4,80 RL	Escaso	Crema	Naranja	2
UC015	5,94 RL	Escaso	Crema	Naranja	2
UC016	9,00 R	Escaso	Blanco	Violeta	1
UC019	6,65 RL	Algodonoso	Blanco	Marrón	2
UC022	7,55 R	Escaso	Blanco	Marrón	2

R = rápido, ML = moderadamente lento, RL = relativamente lento

0 = conidios con los dos extremos redondeados, 1 = conidios con un extremo redondeado y otro agudo (mixto), 2 = conidios con dos extremos agudos

### Índice de crecimiento

Los 16 aislados de *Colletotrichum* spp. presentaron, crecimiento regular y uniforme. El 60% de las colonias presentaron crecimiento relativamente lento (< 7cm de diámetro después de 10 días), el 30% presentaron crecimiento rápido (> 7cm de diámetro después de 10 días) y el 10 % crecimiento moderadamente lento (Tabla 2). No hubo diferencia significativa entre la tasa de crecimiento de los aislados ( $P = 0.1807$ ).

### Morfología de los conidios

Se encontraron dos tipos de conidios en los aislados. El primer tipo correspondió a conidios que presentaban dos extremos agudos, en especial los aislados de Donjulo y el cantón Saraguro (60 % de los aislados). El segundo tipo correspondió a conidios con un extremo redondeado y un extremo agudo (40 % de los aislados). Se ha reportado este tipo de conidios correspondientes al tipo *C. acutatum* (Oliveira et al., 2005). No se diferenciaron conidios con ambos extremos redondeados que corresponden con el tipo de *C. gloeosporioides*.

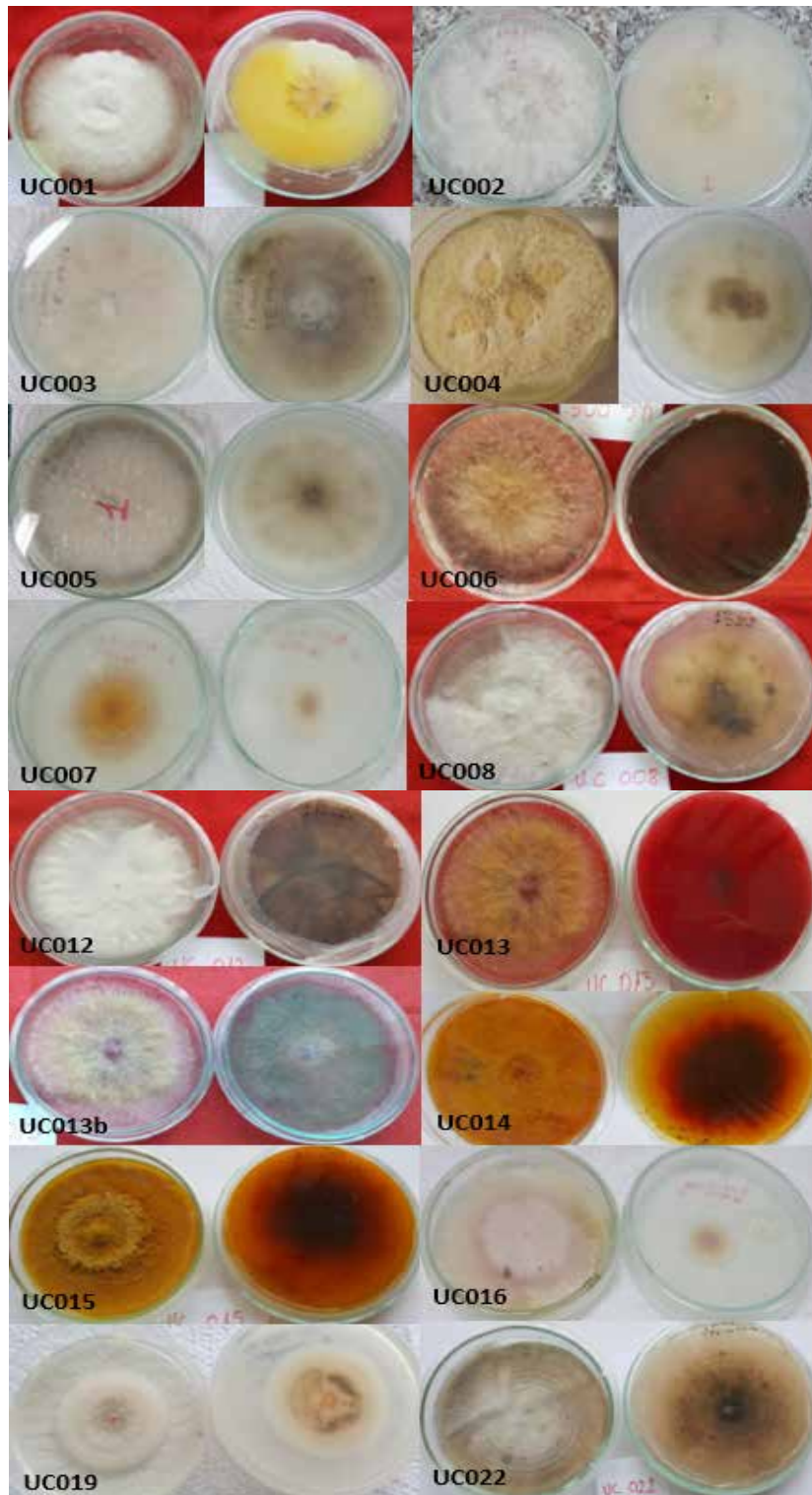


Figura 2. Variabilidad morfológica de colonias de aislados del complejo *Colletotrichum* spp de tomate de árbol en las provincias de Azuay y Loja. Para cada aislado se muestra las superficies superior e inferior de la colonia a los 10 días a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  y  $\pm 75\%$  de humedad relativa, en medio de cultivo PDA.



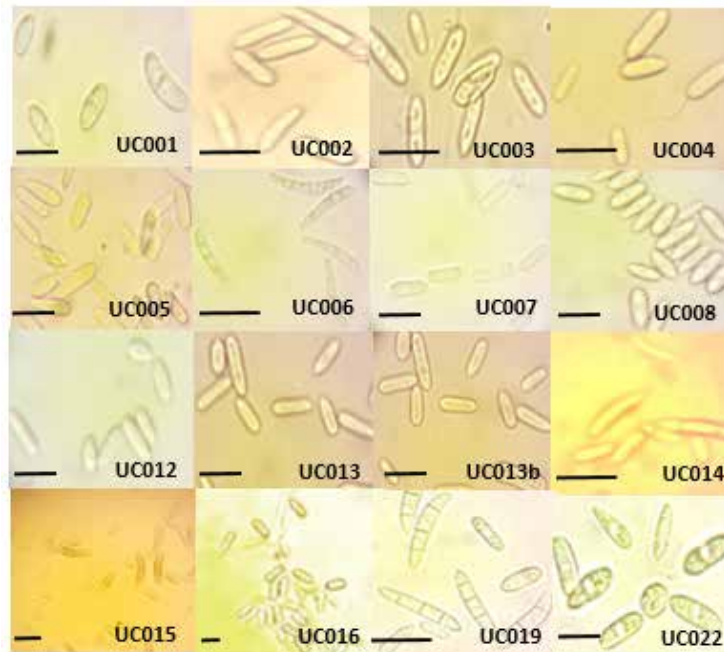


Figura 3. Variabilidad morfológica de conidios de aislados del complejo *Colletotrichum* spp de tomate de árbol en las provincias de Azuay y Loja a los 10 días a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  y 75% de humedad relativa, en medio de cultivo PDA. Todas las barras de escala representan  $10\ \mu\text{m}$ .

### Pruebas de patogenicidad

La patogenicidad de los aislados de *Colletotrichum* spp. en frutos de tomate de árbol por el método de inoculación por herida y goteo mostró síntomas de antracnosis y lesiones que no fueron diferentes en tamaño entre ellas. Las lesiones presentadas fueron típicas de huéspedes susceptibles. Las lesiones aparecieron a partir del cuarto día de inoculación. Para todos los aislados se produjo en los frutos infectados lesiones deprimidas y el desarrollo de micelio de color rosáceo, característico de *C. acutatum* (Figura 4).



Figura 4. Reacción en frutos de tomate de árbol inoculados artificialmente con aislados de *Colletotrichum acutatum* por el método de herida goteo con suspensión de esporas, después de 7 días a  $\pm 24^{\circ}\text{C}$ .

### Análisis moleculares

El ADN de 16 aislados de *Colletotrichum* colectados de tomate de árbol fueron probados con los primers específicos para *C. acutatum* (CaInt2) y *C. gloeosporioides* (CgInt). Las reacciones de PCR para aislados representativos se muestran en la figura 5. Un fragmento de ADN de aproximadamente 490-bp fue amplificado con los primers específicos CaInt2 y ITS4 para *C. acutatum*. Los primers de acuerdo al Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) pueden amplificar tanto *C. acutatum* como *C. tamarilloi*. No se obtuvo ninguna amplificación del ADN de los aislados colectados al utilizar los primers ITS4-Cngt, específicos de *C. gloeosporioides* (resultados no mostrados). En el presente caso se ha determinado por un método molecular (PCR) la presencia de *C. tamarilloi*, perteneciente al complejo *acutatum* en tomate de árbol.

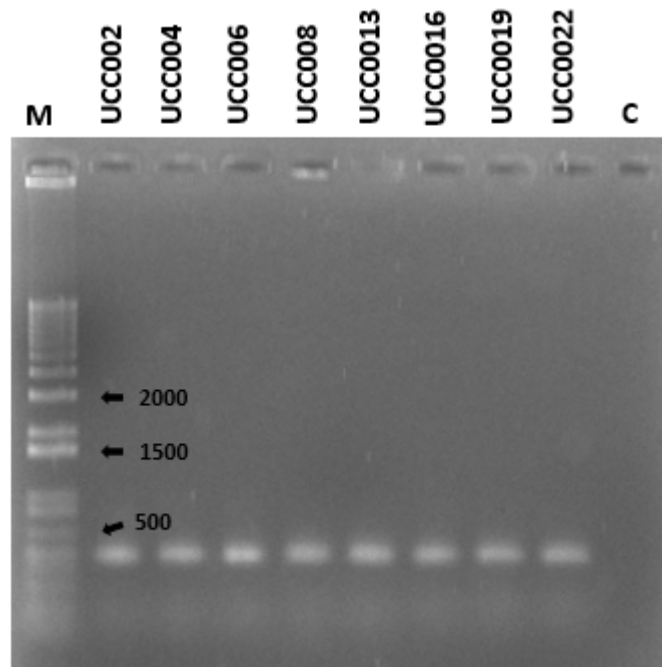


Figura. 5. Identificación específica de *C. acutatum*, con el primer CaInt2 en combinación con el primer diseñado en la secuencia ITS. M: Marcador de Peso Molecular; líneas 1,2,3, 4 y 5: muestras de Azuay; líneas 6, 7 y 8: muestras de Loja; C: control.

## DISCUSION

El presente estudio fue llevado a cabo para clarificar cuál es el agente causal de la antracnosis en tomate de árbol en las provincias de Loja y Azuay, en base a características morfológicas, moleculares y patogénicas. Se determinó que el hongo responsable pertenece al complejo de *C. acutatum*. Las pruebas de patogenicidad en frutos inoculados por herida mostraron que todos los aislados fueron patógenos para el tomate de árbol. Anteriormente la clasificación taxonómica de la especie responsable de la antracnosis se basaba principalmente en el tamaño del conidio y la forma (Cannon *et al.*, 2012). Otras especies del género *Colletotrichum* han sido reportadas como agente causal de la antracnosis en tomate de árbol incluyendo *C. gloeosporioides*. Sin embargo, los síntomas observados en el campo durante la

colecta coincidieron con la descripción de la enfermedad dada por Falconí *et al.* (2013) y Caicedo *et al.* (2017), quienes señalan como responsable al hongo *C. acutatum* y *C. tamarilloi* (complejo *acutatum*), y señalan síntomas como lesiones negras en forma de depresión en los frutos, acompañadas de lesiones con masas de esporas de color rosado.

La caracterización morfológica mostró que el 62,5% de los aislados evaluados en el presente estudio fueron de color crema, 31,25 % blanco y 6,25% amarillo en la parte superior y de color naranja a violeta en el reverso de las cajas. La morfología de la colonia para todos los aislados (superficies superior e inferior) coinciden con las descripciones publicadas para las especies del complejo *C. acutatum* (Than *et al.*, 2008, Falconí *et al.*, 2013, Caicedo *et al.*, 2017). La variación del color obtenida en el presente estudio podría indicar una alta variabilidad que podría ser explicada por la preferencia del huésped por parte de la especie o por aislado geográfico (Nirenberg *et al.*, 2002). En las inoculaciones sobre frutos llevadas a cabo en el laboratorio, en general el color de las colonias cambió con el tiempo de blanco a oscuro, pero el color del micelio fue rosado, lo cual es característico de *C. acutatum* (Than *et al.*, 2008; Falconí *et al.*, 2013, Caicedo *et al.*, 2017).

La tasa de crecimiento de la colonia *in vitro* fue otra característica importante para determinar que el hongo responsable pertenece al complejo *acutatum*. En nuestro estudio la mayor parte de las colonias tuvieron un crecimiento lento, lo cual concuerda con lo publicado por Than *et al.* (2008). En el mismo estudio se señala que la tasa de crecimiento para *C. gloeosporioides* es más elevada. Esta característica era utilizada también para diferenciar las dos especies. En cuanto a los conidios, resulta muy difícil diferenciar morfológicamente *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* debido a la gran variabilidad en las características de colonia y conidios (Bridge *et al.*, 2008; Cannon *et al.*, 2012). Se ha sugerido que las variaciones morfológicas y tamaño de conidios puede estar relacionado a componentes fisiológicos tales como exposición al sol, temperatura y otras variables (Crouch *et al.*, 2006). Afanador-Kafuri *et al.* (2003) y Falconí *et al.* (2013), usaron la forma de los conidios conjuntamente con datos moleculares para establecer a *C. acutatum* como responsable de la antracnosis en tomate de árbol. En nuestro trabajo encontramos conidios de bordes redondeados y agudos, cuyo tamaño fue consistente con los reportados por Afanador-Kafuri *et al.* (2003), Damm *et al.* (2012) y (Oliveira *et al.* 2005) para *C. acutatum*, mientras que conidios cilíndricos han sido asociados con *C. gloeosporioides* (Sutton, 1992).

El uso exclusivo de características morfológicas para identificar diferencias entre poblaciones de *Colletotrichum* ha demostrado ser poco confiable (Sreenivasaprasad y Talhinhos, 2005). Además distinguir los taxones de *Colletotrichum* en general es difícil debido a la falta de protocolos estandarizados y normas internacionales y, por lo tanto, las relaciones taxonómicas dentro del género son poco probables que se resuelven sólo por el uso de caracteres morfológicos tradicionales (Falconí *et al.*, 2013). Las especies de *Colletotrichum*, son muy difíciles de describir sin ambigüedades debido a su amplia variabilidad morfológica y molecular y la morfología de los conidios puede ser afectada por diferencias en condiciones artificiales pero la identificación directa de aislados procedentes de la planta es también difícil porque la morfología de los conidios varía durante el proceso de infección (Pardo *et al.*, 2016; Falconí *et al.*, 2013). Así, es necesario apoyarse en el análisis molecular para la determinación de la especie.

Numerosos estudios han reportado subgrupos dentro de complejo de especies de *C. acutatum*. Los análisis moleculares son capaces de resolver estos complejos de especies y actualmente la clasificación puede hacerse utilizando hasta ocho locus diferentes (Cannon *et al.*, 2012). Análisis moleculares en

multilocus incluyendo los genes ITS, ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH y HIS3, han ayudado a definir el clado como un colectivo con 29 especies estrechamente relacionadas, incluido *C. tamarilloi* (Damm *et al.*, 2012; Cannon *et al.*, 2012). Caicedo *et al.* (2017) demostraron mediante análisis moleculares en multilocus la presencia de *C. tamarilloi*, perteneciente al complejo *C. acutatum* en el callejón Interandino, incluyendo el sur del Ecuador. No obstante, el estudio de Caicedo *et al.* (2017) comprendió solamente tres muestras, dos en Azuay (Paute) y una en Loja (El Valle). En el presente estudio utilizamos 16 aislados y con el uso de primers específicos confirmamos la identificación del complejo *C. acutatum* como el agente causal de la antracnosis en tomate de árbol, en las provincias del Azuay y Loja.

## CONCLUSIONES

El estudio permitió confirmar a nivel morfológico y molecular que el complejo *C. acutatum* es el agente causal de la antracnosis u ojo de pollo en el cultivo de tomate de árbol para las provincias de Azuay y Loja. El presente estudio servirá de base para generar nuevos estudios sobre la variabilidad del hongo y para generar alternativas de manejo y control integrado de esta enfermedad en plantaciones de tomate de árbol.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento especial a Rosa Delgado por su ayuda en el test de repique de aislados e inoculación de frutos con el micelio del hongo. El presente trabajo fue financiado por la Dirección de Investigaciones de la Universidad de Cuenca (DIUC) y el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

## CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Las contribuciones de los autores para el estudio: “*Caracterización morfológica y molecular del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol en Azuay y Loja*”.

Castro-Quezada Patricio y Bravo-Zuñiga, Catalina contribuyeron de igual manera en este trabajo.

Castro-Quezada, P.; Bravo-Zuñiga, C.; y Díaz-Granda, L.: diseño y desarrollo del proyecto, actuaron en todas las etapas de la investigación;

Norma Quillay-Curay: trabajo de laboratorio, sistematización de datos;

Cabrera- Cabrera A.: trabajo de laboratorio, pruebas de patogenicidad;

Ramón- Montoya, M; Belesaca-Morocho, I: colectas y caracterización en campo.

## BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Quezada, P., Martínez-Laborde, J., y Prohens, J. (2011). Variation among tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) accessions from different cultivar groups: implications for conservation of genetic resources and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(6), 943–960.
- Afanador-Kafuri, L., D. Minz, M. Maymon, y S. Freeman. (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, 93, 579-587.
- Alarcón-Restrepo, J. y Chavarriaga-Montoya, J. (2007). Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Penz) Penz & Sacc. en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. *Agron. 15*(1), 89 – 102.
- Albornoz, G. (1992). El Tomate de árbol *Cyphomandra betacea* Sendt en el Ecuador. *Universidad Central, Fundación para el desarrollo agropecuario. Quito, Ecuador.*
- Botero, M. (1999). Estudio de la interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis en tomate de árbol. *PRONATTA-COR-POICA*. 58 pp.
- Bridge, P.D., Waller J.M., Davies D., y Buddie A.G. (2008). Variability of *Colletotrichum kahawae* in relation to other *Colletotrichum* species from tropical perennial crops and the development of diagnostic techniques. *Journal of Phytopathology*, 156, 274–80.
- Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S., y Timmer, L. W. (1996). Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*, 86, 523-527.
- Cabrera, L., Rojas, P., Rojas, S., Pardo-De la Hoz, C.J., Mideros, M.F., Danies, G., Lopez-Kleine, L., Jiménez, P., y Restrepo, S. (2018). Most *Colletotrichum* species associated with tree tomato (*Solanum betaceum*) and mango (*Mangifera indica*) crops are not host-specific. *Plant Pathology*, 67(5), 1022-1030.
- Caicedo, J. D., Lalangui, K.P., Pozo, A.N., Cevallos, P.A., Arahana, A.S., Méndez, K.S. (2017). Multilocus molecular identification and phylogenetic analysis of *Colletotrichum tamarilloi* as the causal agent of Tamarillo (*Solanum betaceum*) anthracnose in the Ecuadorian highlands. *European Journal of Plant Pathology*, 148(4), 983-996.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnstony, P.R., y Weir, B.S. (2012). *Colletotrichum* current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181–213.
- Damm, U., Canon, P.F., Woudenberg, J.C., y Crous, P.W. (2012a). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 37–113.
- Falconí, C. E., Visser, R. G. F., y van Heusden, A. W. (2013). Phenotypic, Molecular, and Pathological Characterization of *Colletotrichum acutatum* Associated with Andean Lupine and Tamarillo in the Ecuadorian Andes. *Plant Disease*, 97(6), 819–827.
- Feicán-Mejía, C.G., Encalada-Alvarado, C.R. y Becerril-Román, A.E. (2016). Descripción agronó-



- mica del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Agroproductividad*, 9(8), 78-86.
- Freeman, S., Katan, T., y Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. *Plant Disease*, 82(6), 596–605.
- Fulton, T.M., Chunwongse, J. y Tanksley, S.D. (1995). Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and Other Herbaceous Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13, 207-209.
- Lobo A., M., Medina C., C. I., y Cardona G., M. (2011). Resistencia de campo a la antracnosis de los frutos (*Colletotrichum gloeosporioides*) en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. Sendt.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*; 53(2), 1129-1142.
- Nelson, P.E., Toussoun T.A y Marasas W.F.O (1983). *Fusarium Species an Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania: *The Pennsylvania State University Press*. 193 pp.
- Nirenberg, H. I., Feiler, U., y Hagedorn, G. (2002). Description of *Colletotrichum lupine* comb.nov. in modern terms. *Mycologia*, 94, 307–320.
- Montri, P., Taylor, P. W. J., y Mongkolporn, O. (2009). Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the causal agent of chili anthracnose, in Thailand. *Plant Dis.* 93,17-20
- Obando J. (2012). Selección de genotipos mejorados de tomate de árbol provenientes de semillas resistentes a antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides*. Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/7390>.
- Oliveira, R., Moral J., Bouhmidi K y Trapero A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31, 531-548.
- Pardo-De la Hoza C. J., Calderon C., Rincon A.M., Cardenas M., Daniesa G., Lopez-Kleine L, Restrepo S. y Jimenez P. (2016). Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. *Plant Pathology*, 65, 227–237.
- Rueda A., Echeverri F., Torres F., Gallego A., Quiñones W. y Lobo M. (2005). Chemical and microbiological profile of the tree tomato (*Cyphomandra* spp.) and its role against *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnosis *Actual Biol*, 27 (1), 117-121.
- Santander, M, Ceron, I y Hurtado, A. (2014). Acción biocida del jugo de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) sobre *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Agro sur*, 42(2),13-17.
- Santillán, F. (2001). Manual del cultivo sustentable de tomate de árbol. Universidad de Cuenca, Ecuador. 53 pp.
- Saldarriaga-Cardona, A., J. Castaño Zapata, y Arango Isaza R. (2008). Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 32(123), 145-156.
- Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R., Meehan, B. M., y Brown, A. E. (1996). Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*, 39,499-512.

- Sreenivasaprasad, S., y Talhinhos, P. (2005). Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Mol. Plant Pathol*, 6,361-378.
- Sutton, B. C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. Pages 1-26 in: *Colletotrichum: Biology, Pathology, and Control*. J. A. Bailey and M. J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Than, P. P., Shivas, R. G., Jeewon, R., Pongsupasamit, S., Marney, T. S., Taylor, P. W. J., y Hyde, K. D. (2008). Epitypification and phylogeny of *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds. *Fungal Divers*. 28,97-108.
- Talhinhos, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martin, J., y Oliveira, H. (2002). Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology*, 92,986-996.
- Viera-Arroyo, W., Sotomayor Correa, A.V., Tamba-Sandoval, M.V., Vásquez-Castillo, W.A., Martínez, A.M., Viteri-Díaz, P.F. y Ron, L.. (2016). Estimación de parámetros de calidad del fruto para segregantes interespecíficos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en respuesta de resistencia a la Antracnosis (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds). *Acta Agronomica*, 65(3), 304-311.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for filogenetics. Pages 315-322 in: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, and J. J. Sninsky, eds. Academic Press, San Diego.