



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

Determinación del agente causal de la antracnosis en *Annona cherimola*
(chirimoya) en el cantón Gualaceo provincia del Azuay

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniero
Agrónomo

Autoras:

Mélida Lizeth Álvarez Fajardo

Diana Andrea Tenesaca Bojorque

CI: 0106679244

CI: 0106664097

lizethalvarezf@gmail.com

andrea.tebo.96@gmail.com

Director:

Ing. Patricio Salvador Castro Quezada PhD.

CI: 1103411151

Cuenca, Ecuador

09-mayo-2022



RESUMEN

La antracnosis es una enfermedad fúngica que causa graves pérdidas en el cultivo de chirimoya en Ecuador. La enfermedad causa graves daños en los frutos y su control se basa principalmente en la utilización de productos químicos. Según estudios realizados se ha reportado como agente causal de la antracnosis en chirimoya principalmente a *Colletotrichum* spp, pero no se ha definido la especie. En el presente estudio se realizó la caracterización morfológica e identificación molecular de 10 cepas de *Colletotrichum* spp. de chirimoya, en diferentes localidades de la provincia del Azuay. Para la caracterización morfológica las variables que se evaluaron fueron: crecimiento de la colonia, coloración de la colonia, tipo de colonia y forma de los conidios. Para la identificación molecular se realizó un análisis PCR con cebadores específicos reportados para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, diseñados en el espaciador de transcripción interna (ITS). En base a las características morfológica y análisis PCR se determinó que en el cantón Guachapala el patógeno responsable de la antracnosis corresponde a un complejo de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, mientras que en Gualaceo la especie causante de la enfermedad es *C. acutatum*.

Palabras clave: Antracnosis. Espaciador de Transcripción Interna (ITS). Caracterización Morfológica. PCR.



ABSTRACT

Anthrachnose is a fungal disease that causes serious losses in the cherimoya crop in Ecuador. The disease causes serious damage to the fruit and its control is mainly based on the use of chemical products. According to studies, *Colletotrichum* spp. has been reported as the causal agent of anthracnose in cherimoya, but the species has not been defined. In the present study, the morphological characterization and molecular identification of 10 strains of *Colletotrichum* spp. of cherimoya was carried out in different localities of the province of Azuay. For morphological characterization, the variables evaluated were: colony growth, colony coloration, colony type and conidial shape. For molecular identification, PCR analysis was performed with specific primers reported for *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*, designed in the internal transcribed spacer (ITS). Based on the morphological characteristics and PCR analysis, it was determined that in Guachapala canton the pathogen responsible for anthracnose corresponds to a complex of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*, while in Gualaceo the species causing the disease is *C. acutatum*.

Key words: anthracnose, internal transcribed spacer (ITS), morphological characterization, PCR.



INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. CHIRIMOYA (<i>ANNONA CHERIMOLA</i>).....	20
3.1.1. Origen.....	20
3.1.2. Descripción botánica.....	20
3.1.3. El cultivo de chirimoya en Ecuador.....	21
3.2. EL GÉNERO <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP. COMO RESPONSABLE DE LA ANTRACNOSIS.....	22
3.2.1. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	24
3.2.1.1. Sintomatología.....	25
3.2.1.2. Condiciones que favorecen la presencia de antracnosis.....	26
3.2.1.3. Manejo de postcosecha para prevenir antracnosis.....	26
3.2.2. <i>Colletotrichum acutatum</i>	27
3.2.2.1. Sintomatología.....	28
3.3. CRITERIOS CLÁSICOS USADOS EN LA IDENTIFICACIÓN.....	29



3.3.1. Caracterización molecular	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1. ÁREA DE ESTUDIO	31
4.2. MATERIALES	34
4.3. MÉTODOS.....	34
4.3.1. Metodología para la investigación experimental del objetivo 1	34
4.3.1.1. Recolección y aislamiento de <i>Colletotrichum</i>	34
4.3.1.2. Caracterización morfológica	35
4.3.1.3. Forma de conidios	36
4.3.1.4. Crecimiento de la colonia.....	37
4.3.1.5. Tipo de micelio.....	37
4.3.1.6. Coloración de la colonia.....	37
4.3.1.7. Pruebas de patogenicidad	37
4.3.2. Metodología para la investigación experimental del objetivo 2	38
4.3.2.1. Definir la especie mediante análisis PCR con primers específicos de 5 especies de <i>Colletotrichum</i> spp.....	38
5. RESULTADOS	40
5.1. RECOLECCIÓN Y AISLAMIENTO DEL HONGO	40
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA COLONIA	40
5.2.1. Índice de crecimiento.....	40
5.2.2. Tipo de micelio.....	41
5.2.3. Coloración de la colonia	41



5.2.4. <i>Morfología de los conidios</i>	41
5.2.5. <i>Pruebas de patogenicidad</i>	45
5.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES RESPONSABLE DE LA ANTRACNOSIS EN LOS CANTONES DE GUALACEO Y GUACHAPALA	46
5.3.1. <i>Amplificación molecular con los primers CaInt2, ITS4; pertenecientes a la especie Colletotrichum acutatum, en los cantones de Gualaceo y Guachapala</i>	46
5.3.2. <i>Amplificación molecular con los primers CL1F, CL2AR; correspondiente a la especie de Colletotrichum gloeosporioides del cantón Guachapala.</i>	47
6. DISCUSIÓN	49
7. CONCLUSIONES	55
8. RECOMENDACIONES	56
9. BIBLIOGRAFÍA	57
10. ANEXOS	66



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales usados en el desarrollo de la investigación.....	34
Tabla 2. Códigos y ubicaciones de los aislados <i>Colletotrichum</i> spp. recolectadas en la provincia del Azuay.....	36
Tabla 3. Primers utilizados para la identificación molecular de <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	39
Tabla 4. Caracterización morfológica de las muestras tomadas en el cantón Gualaceo.....	42
Tabla 5. Caracterización morfológica de las muestras tomadas en el cantón Guachapala.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.....	32
Figura 2. Mapa de ubicación del lote de las muestras tomadas del cultivo de chirimoya de los cantones Gualaceo y Guachapala.....	33
Figura 3. Variabilidad morfológica de conidios de aislados de <i>Colletotrichum acutatum</i> del cultivo de chirimoya de los cantones de Gualaceo y Guachapala a los 10 días a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y 75% de humedad relativa en medio de cultivo PDA.	44



Figura 4. Variabilidad morfológica de conidios de aislados de *Colletotrichum acutatum* del cultivo de chirimoya del cantón Guachapala a los 10 días a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y 75% de humedad relativa en medio de cultivo PDA.....44

Figura 5. Variabilidad morfológica de conidios de aislados del complejo *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* del cultivo de chirimoya del cantón Guachapala a los 10 días a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y 75% de humedad relativa en medio de cultivo PDA.45

Figura 6. Frutos de chirimoya inoculados con los aislados de *Colletotrichum*, mediante el método de herida, estos síntomas se muestran después de días de la inoculación a $\pm 24^{\circ}\text{C}$45

Figura 7. Amplificación de 5 muestras de ADN con los primers CaInt2, ITS4; correspondiente a la especie de *C. acutatum*, en los cantones Gualaceo y Guachapala.....47

Figura 8. Amplificación de 1 muestra de ADN con los primers CaInt2, ITS4; correspondiente a la especie de *C. acutatum* del cantón Guachapala.47

Figura 9. Amplificación de 1 muestra de ADN con los primers CL1F, CL2AR; correspondiente a la especie de *C. gloeosporioides* del cantón Guachapala.48

Figura 10. Amplificación de 1 muestra de ADN con los primers CL1F, CL2AR; correspondiente a la especie de *C. gloeosporioides* del cantón Guachapala.48



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)

ITS: Espaciador transcrito interno (Internal transcribed spacer)

TUB2: Beta-tubulina (Beta-tubulin)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

TAE: Tris acetato de ácido etilendiaminetetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid tris acetate) dNTPs: Nucleósido trifosfato (Nucleoside triphosphate) mM: milimolar

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal

ARN: Ácido ribonucleico

ppm: partes por millón

PDA: Potato Dextrose Agar



Cláusula de Propiedad Intelectual

Mélida Lizeth Álvarez Fajardo autora del trabajo de titulación "**Determinación del agente causal de la antracnosis en *Annona cherimola* (chirimoya) en el cantón Gualaceo provincia del Azuay**" certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 09 de mayo de 2022



Mélida Lizeth Álvarez Fajardo

C.I: 0106679244



Cláusula de Propiedad Intelectual

Diana Andrea Tenesaca Bojorque autora del trabajo de titulación “**Determinación del agente causal de la antracnosis en *Annona cherimola* (chirimoya) en el cantón Gualaceo provincia del Azuay**” certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 09 de mayo de 2022

Diana Andrea Tenesaca Bojorque

C.I: 0106664097



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Mélida Lizeth Álvarez Fajardo en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Determinación del agente causal de la antracnosis en *Annona cherimola* (chirimoya) en el cantón Gualaceo provincia del Azuay”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 09 de mayo de 2022

Mélida Lizeth Álvarez Fajardo

C.I: 0106679244



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Diana Andrea Tenesaca Bojorque en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Determinación del agente causal de la antracnosis en *Anona cherimola* (chirimoya) en el cantón Gualaceo provincia del Azuay”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 09 de mayo de 2022

Diana Andrea Tenesaca Bojorque

C.I: 0106664097



AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradecemos de manera especial a nuestro tutor de tesis el Ing. Patricio Castro PhD. por habernos apoyado, instruido y compartido sus conocimientos para que podamos realizar el presente trabajo de tesis, así como también agradecemos su dedicación y acompañamiento a lo largo de este tiempo. Agradecemos al Ing. Claudio Encalada por habernos recibido tan amablemente en su finca, al Ing. Carlos Feicán por habernos permitido ingresar al INIAP, del mismo modo al Ing. Luis Minchala quien nos acompañó y apoyó en la toma de muestras. Agradecemos también al Ing. Segundo Maita PhD. Ing. Lourdes Díaz PhD y al Ing. Walter Larriva por todas sus enseñanzas y todos los conocimientos que nos transmitieron, así mismo a todos nuestros queridos maestros que con su esfuerzo y dedicación supieron guiarnos y formarnos como excelentes profesionales.

Lizeth Álvarez y Andrea Tenesaca



DEDICATORIA

A mis padres Lenin y Nelly porque con su ejemplo me han forjado como una persona con valores y principios, por haberme demostrado en todo momento su amor y apoyo incondicional, por ser los pilares más importantes en mi vida y la motivación más grande para alcanzar mis sueños.

A mis hermanas Paola y Samantha porque han estado presentes en todas las etapas de mi vida, ayudándome a crecer y empujándome siempre a salir adelante.

A mis abuelitos Enrique y Gerardina por el amor tan grande que me han brindado toda mi vida. Porque en ellos encuentro la paz y la inspiración que necesito para continuar.

A Lizeth mi amiga y compañera de tesis por su apoyo y su sincera amistad, por haber estado en los buenos y malos momentos a largo de todos estos años de carrera.

A Josseline y Paúl por su amistad y estar presentes siempre que necesito una voz de aliento.

Andrea Tenesaca



DEDICATORIA

A Dios quien ha sido mi fortaleza y guía para culminar exitosamente mi carrera profesional y sobre todo me ha bendecido cada momento de mi vida.

A mis amados padres Vinicio y Lucia, gracias a su amor, esfuerzo y apoyo incondicional, hicieron posible que esta meta se cumpla, gracias por guiarme y estar presentes en cada etapa de mi vida.

A mis hermanas Mayra, Carolina y Salomé, mis mejores amigas, siempre me brindan el soporte necesario para cumplir todas mis metas, y sobre todo están presentes en cada momento de mi vida.

A César, mi compañero de vida, que, con su amor y cariño, fue mi sustento, quien me motivó para superarme día a día, sin duda ha sido mi motor y mi apoyo incondicional de esta compleja trayectoria.

Andrea, además de ser mi compañera de tesis, fue una amiga incondicional que me brindó su amistad sincera desde el primer día de clases de la universidad.

Lizeth Álvarez



1. INTRODUCCIÓN

La chirimoya es originaria de los Andes, probablemente entre el sur de Ecuador y el norte de Perú, aunque algunos historiadores también incluyen las regiones andinas de Chile y Colombia (Gironés, et al., 2014). En Ecuador, la provincia de Loja y el llamado Valle Sagrado de Vilcabamba pueden ser centros de biodiversidad. En este valle aún existen chirimoyas silvestres (Gonzáles, 2013).

Según las estadísticas del tercer censo agropecuario nacional, la superficie estimada de producción es de 532 hectáreas y la producción es de 627 toneladas, lo que equivale a 1,34 toneladas por hectárea. En varias provincias de la Sierra, como Azuay, Loja, Pichincha e Imbabura, se reporta una producción de chirimoya de 41, 270, 277 y 39 toneladas respectivamente (MAGAP, 2010).

Dentro de los límites fitosanitarios para la producción de chirimoya, destacan especialmente las enfermedades causadas por hongos, en particular los géneros *Colletotrichum*, *Elsinoe*, *Fusarium*, *Olpitrichum*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Rhizopus* y *Stigmella*, que pueden reducir la calidad comercial del producto (Villanueva, et al., 2008). Entre estos géneros, *Colletotrichum* se considera el patógeno más importante porque puede causar pérdidas considerables si no se controla a tiempo (Villanueva, et al., s.f.).

Colletotrichum incluye más de 100 especies causantes de antracnosis que se encuentran en casi todos los cultivos utilizados en todo el mundo para la producción de alimentos, fibras y piensos, como *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, *C. graminicola*, *C. boninense* y otros. Debido a su importancia científica y económica, la especie *Colletotrichum* ocupa el octavo lugar en el ranking mundial de fitopatógenos (Rojo et al., 2017).



Una de las enfermedades que ataca al cultivo de chirimoya es la mancha negra ocasionada por el hongo *C. gloeosporioides*, que ocasiona pérdidas importantes al atacar el follaje de los árboles que sufren una defoliación severa (Tovar, et al., 2001). La antracnosis en hojas y pudrición en los frutos de chirimoya es ocasionada por algunas especies de *Colletotrichum* (Villanueva, et al., 2008).

La caracterización molecular y morfológica de las especies de *Colletotrichum*, resulta imprescindible para implementar estrategias de control que sean efectivas, sin embargo, implementar medidas de control resulta difícil por la convergencia en un mismo hospedante de varias especies o subespecies de hongos pertenecientes al género *Colletotrichum*. Los factores ambientales pueden influir en la estabilidad de los rasgos morfológicos en la identificación de especies de *Colletotrichum*, así como los criterios de clasificación (Domínguez, et al., 2012).

La identificación precisa, su nivel de variabilidad genética en distintos hospederos, la correlación existente en su grado de patogenicidad, ha representado un reto para el empleo correcto de técnicas de manejo para los cultivos y desarrollar planes de investigación orientados a la resistencia y mejoramiento genético (Cárdenas, 2010). Basándonos en esta problemática el objetivo del presente proyecto es poder determinar si la antracnosis en chirimoya es causada por *C. gloeosporioides* o existen otras especies de este género que ocasionan la enfermedad en chirimoya.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar el agente causal de la antracnosis en chirimoya en el cantón Gualaceo provincia del Azuay.

2.2. Objetivos Específicos

Realizar la caracterización morfológica de 10 aislados de *Colletotrichum* spp.

Definir la especie mediante análisis PCR con primers específicos definidos para 5 especies de *Colletotrichum*.



3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Chirimoya (*Annona cherimola*)

El fruto de chirimoya es muy apreciado por su aroma y el delicado sabor de sus frutos, de aquí que la aceptación desde el punto de vista comercial como fruta exótica sea ampliamente divulgada a nivel internacional, existiendo marcado interés en su expansión. La pulpa de estos frutos es utilizada en forma natural o para la producción de jugos, batidos, helados. Su mercadeo generalmente es a escala local, regional y nacional, raramente ocurre a nivel internacional. Sin embargo, a medida que la chirimoya comienza a ser más conocida es objeto de mayor atención por parte de investigadores, cultivadores y consumidores de un gran número de países (Vanegas, et al., 2016).

3.1.1. Origen

La chirimoya es nativa de los Andes, probablemente entre el Sur de Ecuador y el norte de Perú (Gironés, et al., 2014), algunos historiadores incluyen también zonas andinas de Chile y Colombia. En Ecuador, la provincia de Loja y el llamado valle sagrado de Vilcabamba, son los probables centros de biodiversidad. En este valle todavía subsisten rodales silvestres de chirimoya (González, 2013).

3.1.2. Descripción botánica

El árbol de chirimoya es típicamente caducifolio, consta de una altura de 6 y 10 m, pues este presenta un crecimiento erguido, su tallo tiene una corteza gruesa con una copa redondeada con abundante follaje (Sáyago, et al., 2018). Las hojas son lanceoladas, miden de 10 a 20 cm de largo y 5 a 10 cm de ancho; las flores presentan un cáliz con tres sépalos dispuestos en forma triangular. Posee flores dicotómicas, es decir, que primero maduran las estructuras femeninas



y luego las masculinas, por otra parte, su fruto es un sincarpo carnoso de forma acorazonada, formado por la fusión de varios carpelos con el receptáculo floral. El color varía de verde oscuro brillante cuando está creciendo a verde mate cuando madura, mide de 10 a 30 cm de largo por 10 a 20 cm de ancho. La piel del fruto es coriácea, recubierta de escamas carnosas o tubérculos espiciformes que se desprenden fácilmente cuando el fruto está maduro. La pulpa es blanca, de sabor ácido y aromático y puede representar un 72.0% del peso total del fruto. Contiene numerosas semillas alargadas de forma ovoide y comprimida, de color pardo oscuro brillante, de 1.5 a 2.0 cm de largo (Tacán, 2007).

3.1.3. El cultivo de chirimoya en Ecuador

El Ecuador siendo centro de origen de la chirimoya presenta zonas climáticas favorables, pero su cultivo ha disminuido, existiendo aproximadamente solo 385.2 ha en el país, con un promedio nacional de producción de 10 t/ha, sin embargo, se ha obtenido rendimiento bajo de 2.8 t/ha (Vanegas, et al., 2016).

Se cultiva en las provincias de Imbabura, Pichincha, Azuay y Loja, a una altitud entre los 1500 a 2600 m.s.n.m. Debido a los microclimas que van desde seco a templado semihúmedo la fenología de la chirimoya es variable (Vanegas, et al., 2016).

Las zonas estratégicas para el cultivo de chirimoya, son el suelo del Valle del Chota y Guayllabamba, así como Tumbaco y la Isla Puná en Guayaquil, en los últimos años la fruta ha incrementado su producción por hectárea. La producción de chirimoya se centra en la Provincia de Pichincha por su clima, situación geográfica favorable y suelo fértil (Pineda, et al., 2014).



3.2. El género *Colletotrichum* spp. como responsable de la antracnosis

Colletotrichum se encuentra en un grupo de hongos fitopatógenos responsables de una enfermedad que se conoce con el nombre de antracnosis. Muestra una distribución geográfica amplia y causa importantes pérdidas económicas en un gran número de plantas como cereales, leguminosas, cultivos herbáceos, plantas hortícolas y árboles frutales (Velázquez, et al., 2018). Por otro lado (Saldarriaga, et al., 2008) mencionan que la antracnosis es una enfermedad que puede afectar a los frutales tanto en precosecha como en postcosecha y ocasiona pérdidas importantes en los cultivos.

El hongo *Colletotrichum* spp., es uno de los principales patógenos que ataca a varios cultivos como es el caso del aguacate, en un estudio realizado por (Trinidad, et al., 2017), se aislaron y caracterizaron morfológica y molecularmente 86 cepas del hongo y pudieron identificar 20 cepas de *Colletotrichum* spp., entre ellas *C. gloeosporioides*, *C. hymenocallidis*, *C. siamense* y *C. tropicale*. De las cepas mencionadas solamente *C. gloeosporioides* y *C. tropicale* han sido reportadas en aguacate mientras el resto como *C. hymenocallidis* ha sido reportada principalmente en lirio araña y algunos casos en chile y tomate.

Mientras que Domínguez, et al., (2012) determinó un complejo de especies del patógeno *C. gloeosporioides* y *G. singulata* como el agente causal de la antracnosis en palma aceitera en Venezuela. Comúnmente la antracnosis en palma puede ser ocasionada por diversos patógenos entre ellos *Botryodiplodia palmarum*, *Melanconium* spp. y *C. gloeosporioides*, siendo la última especie reportada solamente en plantas de vivero en América tropical. No obstante, en Venezuela no se había reportado que la antracnosis era ocasionada por especies del género *Colletotrichum* que causen daños en plantaciones adultas de palma aceitera



(Domínguez, et al., 2012). Por otro lado, la pimienta dioica no se encuentra dentro de los hospederos de hongos del género *Colletotrichum*, sin embargo, estudios realizados por Velázquez, et al., (2018), determinaron mediante caracterización morfológica dos especies: *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. En la caracterización molecular se pudo corroborar los resultados de la identificación morfológica y además se confirmaron dos especies más: *C. fragariae* y *C. boninense* (Velázquez, et al., 2018).

Todos los estudios mencionados anteriormente muestran el descubrimiento de especies reportadas de *Colletotrichum* en distintos hospederos que son las causantes de la antracnosis, y por ende causan pérdidas económicas significativas en los diferentes cultivos ya mencionados, sin embargo, no son considerados y en muchas ocasiones son desconocidos. Lo que repercute en controles ineficientes para los cultivos (Pérez, et al., 2003)

Mientras tanto Sandoval, et al., (2008) mencionan que en especies frutales como en el caso de chirimoya la infección por el hospedante *Colletotrichum* causa daños más severos en comparación con especies arbustivas como es en el caso del romero que solo causa lesiones necróticas en hojas y tallos (Sandoval, et al., 2008). Así también una de las enfermedades que ataca al cultivo de chirimoya es la mancha negra ocasionada por el hongo *C. gloeosporioides*, que ocasiona pérdidas importantes al atacar el follaje de los árboles que sufren una defoliación severa (Tovar, et al., 2001). Estudios realizados en México con base a los caracteres moleculares observados, determinó al hongo *C. gloeosporioides* como agente causal de la pudrición seca de frutos en la familia de las anonáceas (Cambero, et al., 2019). En cambio, Villanueva, et al., (2008), muestran que la antracnosis en hojas y pudrición en los frutos de chirimoya es ocasionada por algunas especies de *Colletotrichum* (Villanueva, et al., 2008),



afirmando, en el Estado de México en se encontró a *C. fragariae* y a *C. gloeosporioides* como agente causal de la antracnosis en este cultivo, a esto se le suma lo resultados obtenidos en EEUU que reportan a *C. acutatum* como agente causal de la enfermedad (Villanueva, et al., 2008).

3.2.1. *Colletotrichum gloeosporioides*

El hongo *C. gloeosporioides* es uno de los patógenos más comunes en las plantas y que presenta una mayor distribución en el mundo, ocasiona antracnosis, una enfermedad importante que ataca a los frutos en regiones tropicales y subtropicales. *C. gloeosporioides* tiene una amplia gama de hospedantes, entre ellos la chirimoya (*Annona cherimola* Mill) aguacate (*Persea americana* Mill), mango (*Mangifera indica* L.) y papaya (*Carica papaya* L.). Este hongo se controla con la utilización de fungicidas químicos, pero el uso de estos compuestos puede ocasionar, daños entre ellos: contaminación del ambiente, riesgos de residuos en productos cosechados y el patógeno puede desarrollar resistencia (Ruiz, et al., 2014).

Por otro lado, *C. gloeosporioides* es un hongo cosmopolita que predomina en regiones tropicales y subtropicales. Este hongo crece lentamente in vitro y las colonias suelen ser de color gris claro a oscuro, pero en agar avena el micelio es blanco, ligeramente algodonoso y tiene masas conidiales anaranjadas; en agar papa dextrosa, agar agua y agar avena se puede observar la formación de apresorios. El hongo tiene hifas septadas y produce un apresorios marrón ennegrecido, ovalado, a veces lobulado, en forma de uña., los conidios son transparentes, de tamaño variable, cilíndricos, de ápice romo, de 9 a 24 μm de largo y de 3 a 4,5 μm de ancho en medio agar simple, el 98% son mononucleares, principalmente binucleados en medio líquido. *C. gloeosporioides* favorece la esporulación cuando se cultiva en medio



líquido a 25°C con agitación constante. Los hongos pueden infectar entre 20 y 28°C, pero en ambientes con humedad relativa de 80 a 100%, la temperatura óptima para el crecimiento es de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. El pH óptimo para el crecimiento de hongos es de 5,5 a 7 (Rodríguez, et al., 2009)

3.2.1.1. Sintomatología

Según datos reportados por Villanueva, et al., (2008). Los árboles de chirimoya atacados por el hongo *C. gloeosporioides* sufren defoliación severa, se presenta como lesiones necróticas circulares (diámetro 1 mm a 4 cm) o irregulares, hundidas con bordes levantados, por hundimiento del tejido y con masas de conidios de color salmón-naranja. La pudrición del pedúnculo se muestra como lesiones necróticas circulares alrededor de la base, 2 cm de diámetro y con formación de masas naranja de conidios, el daño se extiende hasta la cáscara y la pulpa (Villanueva, et al., 2018). El ataque se manifiesta principalmente en hojas, la enfermedad se caracteriza por la aparición de lesiones circulares de color verde brillante, las cuales se tornan oscuras, llegando a ocasionar la caída prematura de las hojas. En ramas jóvenes, el hongo induce muerte descendente y puede presentarse la formación de un cancro (Tovar, et al., 2001).

Según un estudio realizado por Rodríguez, et al., (2009) sobre la antracnosis en aguacate determinaron que se manifiesta en varias partes de estos árboles; cuando ataca el fruto en desarrollo, se denomina "viruela", y se observa en un primer momento una mancha circular redonda translúcida, que luego se torna de color marrón oscuro y puede ser profusa; cuando infecta frutos maduros, se denomina "clavo", mostrando lesiones negras hundidas, redondas o irregulares y numerosas esporas rosadas; se presenta como manchas marrones con halo clorótico en las hojas, que puede conducir a la defoliación si la incidencia es alta; en las flores,



se presenta como tizón, provocando la caída o el aborto de los frutos; en las ramas, apariencia marrón o morada, manchas redondas con necrosis rápida (Rodríguez, et al., 2009).

3.2.1.2. Condiciones que favorecen la presencia de antracnosis

Las condiciones ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. En el caso de la antracnosis, la duración de la humedad en la superficie de la hoja afecta directamente el proceso de infección y crecimiento del patógeno en la planta. Las lluvias prolongadas aumentan el desarrollo de enfermedades. Se informa que las altas temperaturas (27 °C) y la alta humedad (80%) durante la maduración de la fruta favorecen la infección y reproducción fúngica. Por otro lado, después de la cosecha, la fruta debe almacenarse o transportarse bajo ciertas condiciones ambientales para evitar la aparición de esta enfermedad, estas condiciones son: temperatura 13°C, 3-5 % O₂, 5-8% CO₂ y 60% humedad relativa (Cerón, et al., 2006).

3.2.1.3. Manejo de postcosecha para prevenir antracnosis

Después de la cosecha de la fruta, generalmente en la tercera madurez (escala colombiana), se puede lavar con agua y un fungicida, o remojar en una solución que generalmente contiene los ingredientes activos tiabendazol o procloraz, que debe cambiarse continuamente para evitar la contaminación y para tomar las medidas de protección adecuadas. Después de remojar, dejar que la fruta se seque por completo y posteriormente asegurar cada fruta con una malla o espuma para que no se golpee la fruta (López, 2018).

Después del envasado, la fruta debe entrar en la cadena de frío entre 12-14°C, lo mejor es mantener la temperatura constante, ya que, si la temperatura es alta, la respiración de la fruta aumentará, y por lo tanto se condensará el agua en el empaque dando una condición óptima



para el desarrollo de antracnosis. Además, se debe evitar golpear la fruta para evitar que se ablande la epidermis. Otro control postcosecha para la antracnosis es el tratamiento térmico, que consiste en remojar la fruta en agua caliente a 49°C durante 10 minutos o colocar la fruta en agua fría a 4°C durante 5 minutos y luego remojar inmediatamente en agua caliente produciendo así un choque térmico (Landeró, et al., 2016).

3.2.2. *Colletotrichum acutatum*

Hongo que se encuentra en estado asexual en la naturaleza, morfológicamente se caracteriza por tener un micelio enramado, septado de color blanco, acérvulos de color salmón en forma de circular con setas en el borde, los conidios presentan una forma ovoide, las esporas llegan a ser tan numerosas que forman una masa brillante de color rosado. El desarrollo de la enfermedad se basa en: germinación, formación del tubo germinativo, formación del apresorio, penetración y colonización (Barriga, 2012).

Representa uno de los principales patógenos en agricultura y responsable de importantes pérdidas económicas en especies frutales de climas templados, subtropicales y tropicales. Es el agente causal de la antracnosis y la caída prematura del fruto en gran variedad de cultivos, tiene un gran éxito en su estrategia de ataque a tejidos jóvenes, viejos y físicamente vulnerables. A pesar de esto, existen escasos estudios sobre aspectos importantes de su biología, lo que impide poder realizar una correcta identificación para efectuar un eficiente control posteriormente (Wharton, et al., 2004), ocasiona la enfermedad conocida como antracnosis en un sin número de plantas en todo el mundo, causando daños graves especialmente en la producción comercial de frutas (Damm, et al., 2012). La infección y propagación del hongo puede ser aventajada por niveles de humedad desde el 90% lo que



facilita la germinación de las esporas, la temperatura óptima para el hongo es de 25 °C, la que juega un papel importante en la penetración del mismo (Arboleda, 2007).

3.2.2.1. Sintomatología

Siendo un patógeno intracelular hemibiotrófico actúa no solo en la naturaleza biotrófica sino también en sus habilidades para penetrar la pared celular y crecer dentro del lumen. Su principal fuente de inóculo son las esporas que están presentes en ramas, hojas, inflorescencia y en el fruto (Barriga, 2012).

A pesar de su naturaleza destructiva, el éxito de la enfermedad ocasionada por este hongo depende de la forma en la que inicia la infección y coloniza el tejido, presenta un proceso infectivo en dos fases una asintomática inicial donde el patógeno se establece en el hospedero y la fase destructiva que se denota por la sintomatología que presenta el organismo afectado (Barriga, 2012)

No se ha reportado a *C. acutatum* como el causante de la antracnosis en chirimoya, no existe datos de la sintomatología en este cultivo, no obstante, en frutos semimaduros y maduros de fresa (*Fragaria*), la enfermedad se caracterizó por mostrar lesiones hundidas de forma circular e irregular en el fruto, inicialmente acuosas y luego secas, una tonalidad marrón oscuro, donde se observan zonas de color salmón correspondientes a las masas de conidios (Farrera, et al., 2007). Del mismo modo, en el cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense*) se ha reportado que *C. acutatum* se presenta en los frutos como una mancha necrótica y ablandamiento, además de aparición de micelio en la zona afectada (Caicedo, et al., 2007).



3.3. Criterios clásicos usados en la identificación

Las especies de *Colletotrichum* se identifican tradicionalmente de acuerdo con criterios taxonómicos clásicos, como la forma y el tamaño de los conidios y las esporas, la formación de ascas, la presencia de setas, la morfología, la tasa de crecimiento y el color de la colonia. Los aislamientos de *Colletotrichum* exhibieron una gran variabilidad fenotípica, arrojando valores intermedios entre estas: características morfológicas y de cultivo, lo que dificultó su identificación. Uno de los datos morfológicos más utilizados es la forma y el tamaño de los conidios, y aunque puede ser útil como criterio para distinguir ciertas especies, en ocasiones no es concluyente, incluso teniendo en cuenta que las cepas de *Colletotrichum* pueden producir conidios secundarios. De las esporas primarias, suelen ser más pequeñas y morfológicamente variables. Por otro lado, la presencia de ascas en el laboratorio es muy variable en las cepas de *Colletotrichum* y muchas cepas pierden la capacidad de producirlas después de varias resiembras, por tanto, este tampoco puede adoptarse como un criterio válido para la diferenciación. A las limitaciones de los caracteres taxonómicos clásicos se suman los problemas en la denominación de las especies, debido a la costumbre de designar los nombres de las distintas especies atendiendo casi exclusivamente al tipo de huésped donde fue aislado por primera vez, este es el caso del nombre *C. fragariae* que fue nombrado así cuando Brooks (1931) lo aisló de plantas del género *Fragaria*, y que posteriormente fue incluido como sinónimo de *C. gloeosporioides* por von Arx (1957), aunque en 1981 el mismo von Arx vuelve a mantener las dos especies como distintas (Garcés, et al., 2008).

3.3.1. Caracterización molecular

Las técnicas de biología molecular necesitan analizar los ácidos nucleicos extraídos de los organismos para poder detectarlos e identificarlos, la extracción de ADN o ARN es el paso



más importante dentro de una caracterización molecular, debido a que la muestra debe ser purificada de forma adecuada para evitar contaminación con muestras de inhibidores que impiden la correcta realización de la técnica a utilizarse (Diz, 2020)

La técnica PCR radica en la amplificación de un región concreta de ADN utilizando cebadores o primers específicos que son secuencias de ADN que definen la banda amplificación, tienen una extensión de 15 a 30 nucleótidos y son complementarios a la región del ADN que se desea amplificar. En este método se basa la acción de distintas enzimas una de ellas la ADN polimerasa, encargada de concentrar a los nucleótidos en la síntesis de las nuevas cadenas de ADN. La PCR transcribe lo que ocurre en el interior de la célula, la muestra extraída de ADN se agrega en un tubo eppendorf en conjunto con los primers, los desoxinucleótidos, una ADN polimerasa termoestable y un cofactor de esta enzima, posteriormente se someten a una serie de ciclos con cambios de temperatura lo que harpa que se amplifique la región concreta del ADN de la muestra (Diz, 2020).

Los marcadores PCR constituyen una importante herramienta para lograr diferenciar entre una amplia gama de fitopatógenos estrechamente relacionados, además este tipo de marcadores son rápidos, baratos y la mejor opción para analizar grandes cantidades de muestras, pues solo se requiere mínimas cantidades de ADN (Weising, et al., 2005), también se han considerado como uno de los métodos más usados para identificar especies, además presenta ventajas como su alta sensibilidad, su reproducibilidad en diversos huéspedes y tipos de muestras, además tiene un metodología simple y rápida de aplicar (Galvis, et al., 2014).

Las primeras aplicaciones de datos de secuencias de ADN para distinguir entre especies del hongo *Colletotrichum* fueron divulgadas por los autores Mills, et al., (1992) y



Sreenivasaprasad, et al., (1992), quienes identificaron variación de secuencia en la región ITS1 del ADN entre seis especies de *Colletotrichum*, además detectaron polimorfismos en la misma región entre cepas de *C. gloeosporioides* hospederos, luego surgieron estudios más completos mostrando los primeros árboles NJ para *Colletotrichum*, utilizando secuencias ITS2 y LSU de 27 cepas indicadas como pertenecientes a 13 especies. Un segundo estudio filogenético realizado por Sreenivasaprasad, et al., (1996) utilizando el análisis de parsimonia de las secuencias ITS1 y 2 de 18 especies de *Colletotrichum*, los autores pudieron identificar seis grupos infragenéricos (Cannon, et al., 2012).

La identificación adecuada de un organismo permite conocer los patrones de comportamiento de la especie o del grupo taxonómico, facilitando el acceso a la información científica y técnica generada, que se pueda aplicar en el desarrollo de alternativas tecnológicas para la estructuración de planes de manejo de la enfermedad (Saldarriaga, et al., 2008). Con esto se puede lograr una aplicación eficiente de fungicidas de síntesis química para controlar la antracnosis, disminuyendo así los problemas de contaminación ambiental relacionados con el mal uso de los compuestos químicos que resulta en un impacto negativo sobre los organismos benéficos presentes en el ambiente, también se puede proporcionar un adecuado manejo del cultivo y control del patógeno, porque se conoce el comportamiento del mismo, resultando también en una reducción en los costos de producción (Giraldo, et al., 2016).

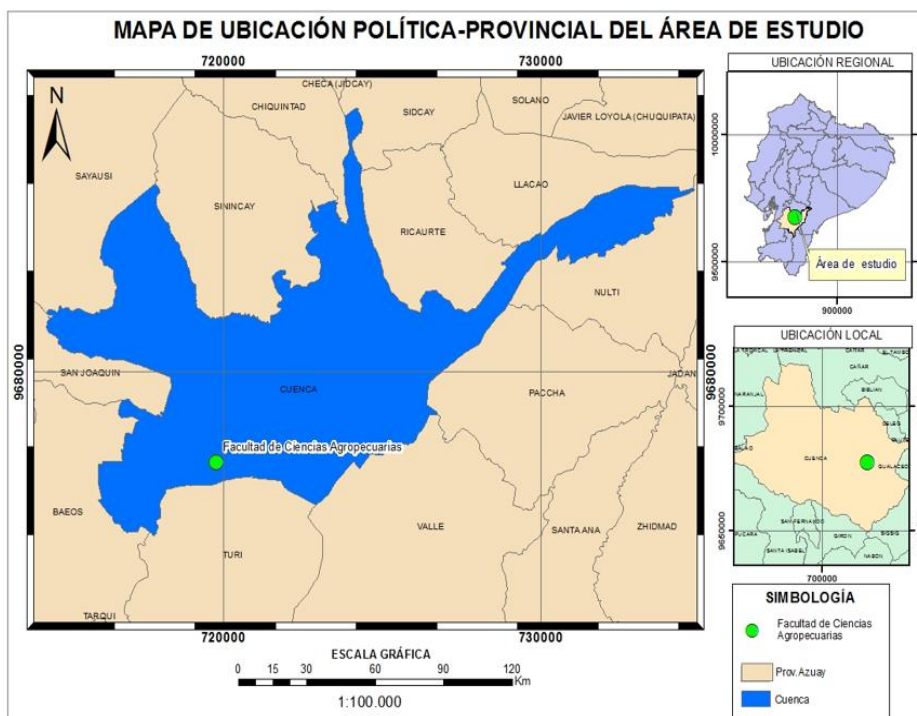
4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Biotecnología y Fitopatología, ubicados en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el campus Yanuncay

de la Universidad de Cuenca, los mismos que cuenta con todos los equipos necesarios para realizar la investigación, a su vez se encuentra ubicado en el sector Yanuncay a una altura de 2567 m.s.n.m., con coordenadas UTM 2°55'12.6"S 79°01'30.6"W. En el laboratorio de Biotecnología se realizó la identificación molecular y en el laboratorio de Fitopatología se realizó la caracterización morfológica.

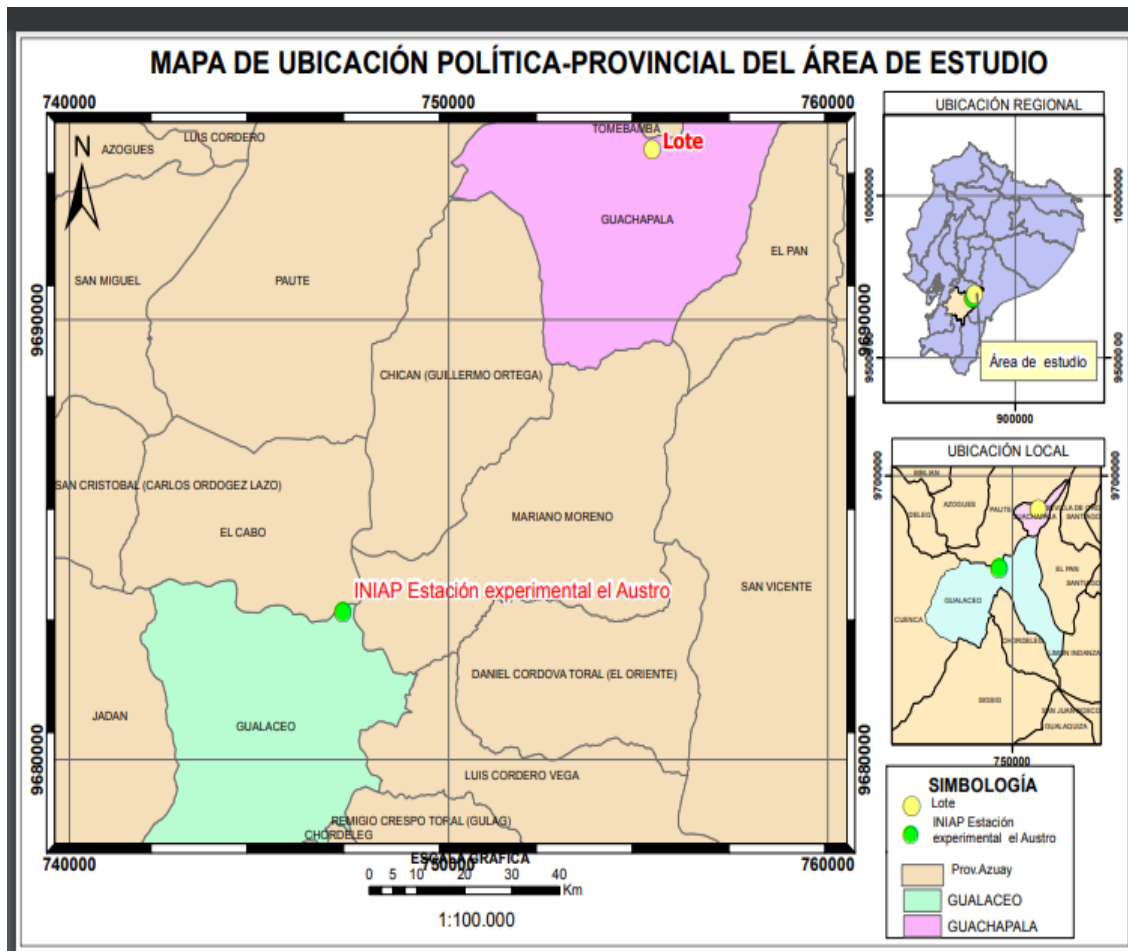
Figura 1. Mapa de ubicación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.



Fuente: Álvarez; Tenesaca

En cuanto a la recolección de las muestras se realizó en la Estación Experimental del Austro (INIAP) ubicado en Gualaceo, lugar en donde se recolectó las 5 primeras muestras, y en el cantón Guachapala en la finca del Ing. Claudio Encalada se recolectó otras 5 muestras más.

Figura 2. Mapa de ubicación del lote de las muestras tomadas del cultivo de chirimoya de los cantones Gualaceo y Guachapala.



Fuente: Álvarez; Tenesaca



4.2. MATERIALES

Tabla 1. Materiales usados en el desarrollo de la investigación.

BIOLÓGICOS	FÍSICOS	LABORATORIO
Plantas de <i>Annona cherimola</i> , ADN <i>Colletotrichum</i> spp.	Libreta de campo, etiquetas, fundas de papel.	Puntas para micropipetas, tubos de microcentrífuga, guantes, mascarilla, mandil.
EQUIPOS	REACTIVOS	PROGRAMAS
Incubadora, refrigerador, balanza de precisión centrífuga, autoclave agitador, vortex.	Agua destilada, alcohol al 70%, agarosa, papa, dextrosa, agar, azul de metileno, ácido láctico, cloro, TAE 1X.	Software Excel, Word, R.

4.3. Métodos

4.3.1. Metodología para la investigación experimental del objetivo 1

4.3.1.1. Recolección y aislamiento de *Colletotrichum*

La colecta de muestras se realizó en dos zonas productoras de chirimoya, en el cantón Gualaceo (5 muestras) y en Guachapala (5 muestras), en huertos que presentaban síntomas comunes de antracnosis y evidentes lesiones necrosas en los frutos. Se tomaron muestras de las hojas y frutos y se asignó un código a cada muestra (Tabla 2).

Una vez las muestras llevadas al laboratorio se realizó el protocolo de desinfección que consiste en lavar las muestras con agua, luego se coloca en recipientes alcohol al 70%, cloro y nuevamente alcohol al 70%, las muestras pasan por los tres recipientes durante 1 minuto; y, finalmente se enjuaga las muestras con agua destilada. Posterior a esto se dejó las muestras en



una cámara húmeda por un período de 5 días, luego de esto se tomó una muestra de la zona de esporulación con ayuda de una cinta, como se observa en el Anexo 2, Foto 4.

Seguidamente se tiñeron las muestras con azul de metileno y se observó en el microscopio para verificar que se trate del hongo *Colletotrichum* spp. A continuación, muestras del hongo se sembraron en cajas Petri con medio PDA (Potato Dextrose Agar TM MEDIA 344). Los aislados que crecieron, se purificaron con subcultivos en cajas Petri, como se observa en el anexo 2, foto 2. Se realizaron cultivos monospóricos de cada aislado, utilizando la metodología de Nelson, et al., (1983).

4.3.1.2. 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 (tres repeticiones) los aislados fueron incubados en una cámara de clima constante MEMMERT a ± 25 °C y $\pm 75\%$ de humedad relativa durante 10 días. Las variables evaluadas fueron: forma de conidios, crecimiento de la colonia, tipo de micelio y coloración de la colonia, como se muestra en el anexo 2, foto 1, de acuerdo a la metodología modificada de (Nelson, et al., 1983).



Tabla 2. Códigos y ubicaciones de los aislados *Colletotrichum* spp. recolectadas en la provincia del Azuay.

Código	Localización (Sector-Provincia)	Tejido afectado	Coordenadas UTM
IN-P1	Gualaceo (INIAP), Azuay	Frutos, hojas	2.865271-78.777599
IN-P2	Gualaceo (INIAP), Azuay	Frutos, hojas	2.865753-78.777749
IN-P3	Gualaceo (INIAP), Azuay	Frutos, hojas	2.865445-78.778132
IN-P4	Gualaceo (INIAP), Azuay	Frutos, hojas	2.864816-78.778238
IN-P5	Gualaceo (INIAP), Azuay	Frutos, hojas	2.864933-78.778420
G-P6	Guachapala, Azuay	Frutos, hojas	2.764070-78.711298
G-P7	Guachapala, Azuay	Frutos, hojas	2.763931-78.711159
G-P8	Guachapala, Azuay	Frutos, hojas	2.764070-78.711041
G-P9	Guachapala, Azuay	Frutos, hojas	2.764135-78.711277
G-P10	Guachapala, Azuay	Frutos, hojas	2.763952-78.711073

4.3.1.3. Forma de conidios

Para la producción de conidios, los aislados se sembraron en medio de cultivo con papa-dextrosa-agar (PDA), de los 10 aislados se realizó 3 repeticiones de cada caja dándonos un total de 30 cajas Petri con el hongo *Colletotrichum* spp, luego de esto se tomó una sección de cada aislado, se colocó en un portaobjetos cuadrículado con una gota de lactofenol, 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.



4.3.1.4. Crecimiento de la colonia

La variable de crecimiento de las colonias se evaluó mediante la toma de datos diarios del hongo *Colletotrichum* spp., una vez realizada la siembra de los aislados se tomó los datos del crecimiento con la ayuda de un calibrador, durante 10 días.

4.3.1.5. Tipo de micelio

La evaluación del tipo de micelio de los aislados se realizó mediante observación directa de cada asilado y se registró el tipo de micelio, la presencia, ausencia, los mismos fueron clasificados de la siguiente manera: NA= no algodonoso, LA= ligeramente algodonoso, MA= moderadamente algodonoso, AA= abundante algodonoso (*ver tabla 4 y 5*).

4.3.1.6. Coloración de la colonia

La coloración de la colonia fue evaluada según observación directa de cada uno de los aislados y se describieron según la tonalidad que presentaban los mismos. Los colores observados varían desde el blanco, blanco cremoso hasta el gris oscuro (*ver Foto 8*).

4.3.1.7. Pruebas de patogenicidad

Para las pruebas de patogenicidad de los aislamientos obtenidos se verificó en frutos de chirimoya. 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. Los frutos se inocularon mediante el método de inoculación por herida y depositando la suspensión conidial sobre el área de la herida previamente demarcada (Than, et al., 2008) (*ver Foto 5*).



Como control, se inoculó agua destilada estéril. Los frutos inoculados fueron colocados en cámaras húmedas las mismas se encontraban en condiciones estériles (humedad relativa cercana al 95 %) (Montri et al., 2009), a temperatura ambiente ($\pm 24^{\circ}\text{C}$), y sometidos a regímenes normales de luz durante siete días (Than et al., 2008). Se inoculó un total de 12 frutos y transcurridos 7 días después que los frutos fueron inoculados se procedió a evaluar los síntomas de la enfermedad tomando fragmentos del área inoculada o el borde de las lesiones (en caso de no observar síntomas). La muestra obtenida del organismo aislado se cultivó en medio PDA y su morfología y los caracteres de la colonia se compararon con el cultivo inicialmente inoculado (*ver Foto 4*).

4.3.2. Metodología para la investigación experimental del objetivo 2

4.3.2.1. Definir la especie mediante análisis PCR con primers específicos de 5 especies de *Colletotrichum* spp.

Para la extracción de ADN de las cepas de *Colletotrichum* recolectadas se utilizó el protocolo de Fulton y Tanksley (1995) (*ver Anexo 1*).

Con el ADN de 10 muestras de cada especie de *Colletotrichum*, se realizó la identificación molecular con primers específicos para las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, por triplicado. Esto permitió identificar la especie responsable de la antracnosis en *A. cherimola*, mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Primers utilizados para la identificación molecular de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.

Especie	Gen	Primers	Dirección	Secuencia (5'-3')
<i>C. acutatum</i>	ITS (Internal transcribed spacer)	ITS4	For.	TCCTCCGCTTATTGATATGC
		Calnt2	Rev.	GGGGAAGCCTCTCGCGG
<i>C. gloeosporioides</i>	Calmodulin (CAL)	CL1F	For.	GARTWCAAGGAGGCCTTCTC
		CL2AR	Rev.	TTTTTGCATCATGAGTTGGAC

Las reacciones de PCR tuvieron un volumen final de 25 μ l compuesta de 13.55 μ l de H₂O estéril, 2.5 μ l de Buffer 10X, 0.75 μ l de MgCl₂, 0.5 μ l de cada uno de los dNTPs (2 mM), 2.5 μ l de cada primer (5 μ l), 1 μ l de ADN polimerasa (Invitrogen) y 1 μ l de ADN a una concentración de (50 ng/ μ l). 0.20 μ l de Taq (ver *Foto 3*).

Las condiciones de PCR se realizaron en el termociclador Eppendorf Mastercycler NexusGSX1 y estuvo compuesta de una desnaturalización inicial de 95 °C durante 30 segundos, seguida de una desnaturalización de 60 °C durante 30 segundos, se programó para una repetición de 30 ciclos, concluyendo con una temperatura de extensión final de 72 °C durante 1.5 minutos.

Los resultados obtenidos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 0.5% en buffer TAE1X, con una electroforesis durante un tiempo de 40 min, posterior una tinción de bromuro de etidio por 40 min (Lalanguí, 2015).



5. RESULTADOS

5.1. Recolección y aislamiento del hongo

Se obtuvieron 10 aislados monospóricos de *Colletotrichum spp.*, los cuales fueron recolectados en los cantones Gualaceo y Guachapala. En los aislados recolectados se evidenciaron síntomas típicos de antracnosis en los frutos de chirimoya inoculados. Una vez observado los síntomas se aisló nuevamente el patógeno y sus características morfológicas mostraron similitud al originalmente inoculado, cumpliendo de esta manera los postulados de Koch.

5.2. Caracterización de la colonia

Se encontraron diferentes tipos de morfología en cuanto al color de los aislados en medio PDA. Evidenciando por otro lado diferentes cambios de tonalidades de las colonias que iban de claras a oscuras en el lapso de los días (Tabla 4).

El crecimiento de cada uno de los aislados fue regular y progresivo en el medio PDA, ya que en el transcurso de 10 días a $\pm 25^{\circ}\text{C}$, las cajas Petri estuvieron recubiertas la mayoría en su totalidad por el micelio.

5.2.1. Índice de crecimiento

El crecimiento de los aislados fue regular y progresivo en medio PDA, al llegar a los 10 días el 90% de los aislados cubrió completamente la caja Petri, mientras que el 10% restante tuvo un crecimiento más lento, ocupando el 40% de la caja Petri al llegar al décimo día. No se encontró diferencia significativa entre la tasa de crecimiento de los aislados ($P= 0.03501$) (ver Foto 7).



5.2.2. Tipo de micelio

El tipo de micelio en el 40% de las muestras fue ligeramente algodonoso, 50% mostró un micelio moderadamente algodonoso y el 10% restante un micelio abundante algodonoso. Se observó el crecimiento de un micelio aéreo escaso en el 90% de los aislados y 10% de tipo abundante algodonoso (Tabla 4 y 5).

5.2.3. Coloración de la colonia

Se visualizaron tres tipos de tonalidades en las muestras: blanca, blanca-cremosa y gris oscuro. El 30% de las muestras mostró una coloración blanca-cremosa, el 10% presentó una coloración gris oscura y el 60% mostró una tonalidad blanca (Tabla 4 y 5).

5.2.4. Morfología de los conidios

Se encontraron tres tipos de conidios en los aislados. El primero correspondió a conidios que presentaban dos extremos redondeados con un total del 30% de los aislados. El segundo tipo correspondió a conidios con un extremo redondeado y el otro extremo agudo con un total del 50% de los aislados. El tercer tipo correspondió a conidios con los dos extremos agudos con un total del 20% de los aislados.

**Tabla 4.** Caracterización morfológica de las muestras tomadas en el cantón Gualaceo.

Código	Díámetro (cm)	Crecimiento	Tipo de micelio	Coloración	Forma de conidios
IN-P1.1	6.4 ± 3.41	R	LA	Blanco	0
IN-P1.2	7.2 ± 3.30	R	LA	Blanco	0
IN-P1.3	7.3 ± 3.41	R	LA	Blanco	0
IN-P2.1	7.1 ± 3.47	R	MA	Blanco - crema	1
IN-P2.2	7.1 ± 3.35	R	MA	Blanco - crema	1
IN-P2.3	7.2 ± 3.35	R	MA	Blanco - crema	1
IN-P3.1	7.2 ± 3.04	R	LA	Blanco	2
IN-P3.2	7.1 ± 2.97	R	LA	Blanco	2
IN-P3.3	6.9 ± 2.96	R	LA	Blanco	2
IN-P4.1	7.3 ± 3.02	R	MA	Blanco	2
IN-P4.2	7.3 ± 3.09	R	MA	Blanco	2
IN-P4.3	7.3 ± 3.79	R	MA	Blanco	2
IN-P5.1	7.4 ± 3.83	R	LA	Blanco	2
IN-P5.2	7.3 ± 3.85	R	LA	Blanco	2
IN-P5.3	7.3 ± 3.45	R	LA	Blanco	2

R= rápido (1 a 5 días). LA= ligeramente algodonoso, MA= moderadamente algodonoso, AA= abundante algodonoso.

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

**Tabla 5.** Caracterización morfológica de las muestras tomadas en el cantón Guachapala.

Código	Diámetro (cm)	Crecimiento	Tipo de micelio	Coloración	Forma de conidios
G-P6.1	6.8 ± 3.57	R	LA	Blanco	1
G-P6.2	6.8 ± 3.52	R	LA	Blanco	1
G-P6.3	6.7 ± 3.46	R	LA	Blanco	1
G-P7.1	7.4 ± 3.28	R	MA	Blanco - crema	2
G-P7.2	7.3 ± 3.19	R	MA	Blanco - crema	2
G-P7.3	7.4 ± 3.31	R	MA	Blanco - crema	2
G-P8.1	7.2 ± 3.69	R	ME	Blanco	2
G-P8.2	7.0 ± 3.70	R	ME	Blanco	2
G-P8.3	7.1 ± 3.05	R	ME	Blanco	2
G-P9.1	7.3 ± 3.81	R	MA	Blanco - crema	1
G-P9.2	7.3 ± 3.84	R	MA	Blanco - crema	1
G-P9.3	7.3 ± 3.12	R	MA	Blanco - crema	1
G-P10.1	3.4 ± 1.98	R	AA	Gris oscuro	0-2
G-P10.2	3.7 ± 2.02	R	AA	Gris oscuro	0-2
G-P10.3	2.9 ± 1.25	R	AA	Gris oscuro	0-2

R= rápido (1 a 5 días). LA= ligeramente algodonoso, MA= moderadamente algodonoso, ME= moderadamente escaso, AA= abundante algodonoso.

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

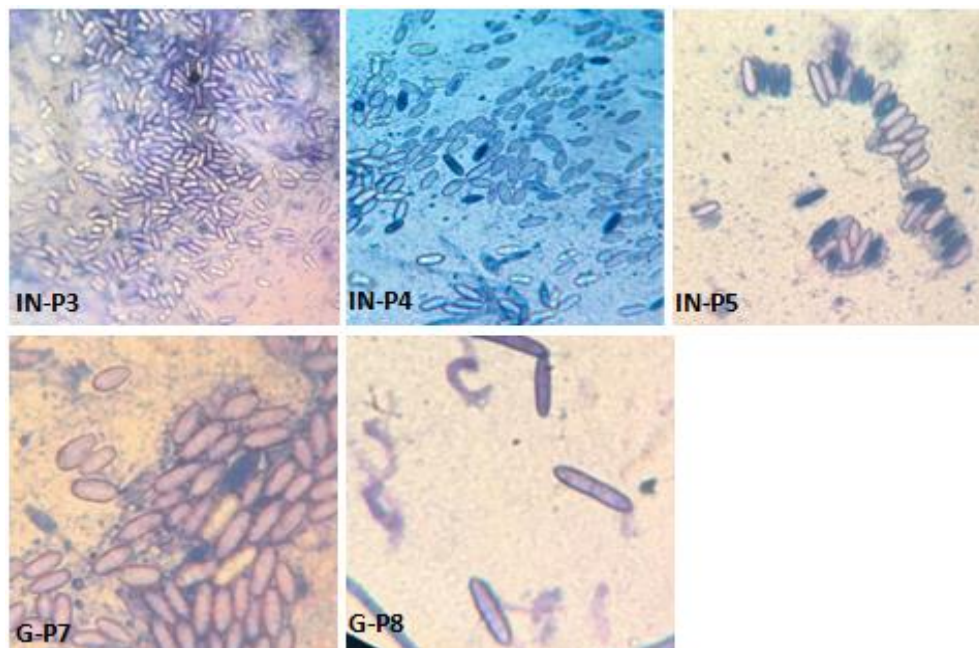


Figura 3. Variabilidad morfológica de conidios de aislados de *Colletotrichum acutatum* del cultivo de chirimoya de los cantones de Gualaceo y Guachapala a los 10 días a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y 75% de humedad relativa en medio de cultivo PDA.

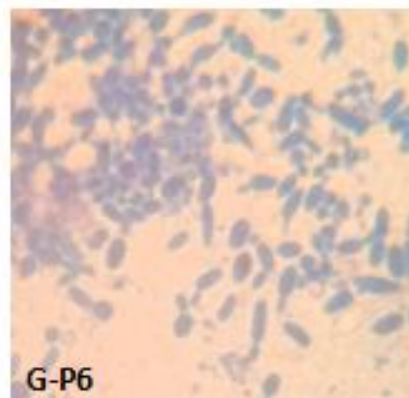


Figura 4. Variabilidad morfológica de conidios de aislados de *Colletotrichum acutatum* del cultivo de chirimoya del cantón Guachapala a los 10 días a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y 75% de humedad relativa en medio de cultivo PDA.

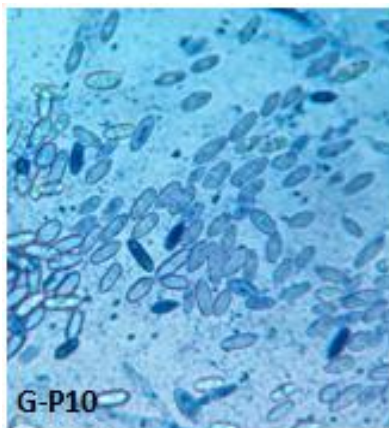


Figura 5. Variabilidad morfológica de conidios de aislados del complejo *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* del cultivo de chirimoya del cantón Guachapala a los 10 días a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y 75% de humedad relativa en medio de cultivo PDA.

5.2.5. Pruebas de patogenicidad

La patogenicidad de *Colletotrichum* spp. de sus aislados en los frutos de chirimoya inoculados mediante el método de herida, observando síntomas de antracnosis, se evidenció que las lesiones presentadas fueron típicas de huéspedes susceptibles. A partir del 5to día de inoculación aparecieron lesiones, las mismas fueron necrosis típicas de *Colletotrichum* spp, es decir presentaban una coloración marrón oscuro.



Figura 6. Frutos de chirimoya inoculados con los aislados de *Colletotrichum*, mediante el método de herida, estos síntomas se muestran después de días de la inoculación a $\pm 24^{\circ}\text{C}$.



5.3. Identificación molecular de las especies responsable de la antracnosis en los cantones de Gualaceo y Guachapala

La identificación molecular de las cepas de antracnosis se realizó con primers específicos para complejo *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. definidos para los genes CaInt2, ITS4; CLIF, CL2AR. En los primers utilizados se identificó amplificación para antracnosis perteneciente al complejo *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, mostrando amplificación de bandas visibles para esta enfermedad.

5.3.1. Amplificación molecular con los primers CaInt2, ITS4; pertenecientes a la especie *Colletotrichum acutatum*, en los cantones de Gualaceo y Guachapala

Para la pareja de primers utilizados en la PCR correspondientes para CaInt2, ITS4 en la figura 7, se muestra un total de 8 bandas, donde se evidenció amplificación de 5 bandas las cuales corresponden a las muestras (IN-P3, IN-P4, IN-P5, G-P7, G-P8) de ADN amplificadas con un peso molecular de 500 pb. En la figura 8 se muestra un total de 6 bandas, las cuales se evidencio amplificación de 1 banda correspondiente a la muestra (G-P10) de ADN amplificadas con un peso molecular de 500 pb, este proceso se realizó con un gel de agarosa al 5% al ser teñidas con bromuro de etidio.

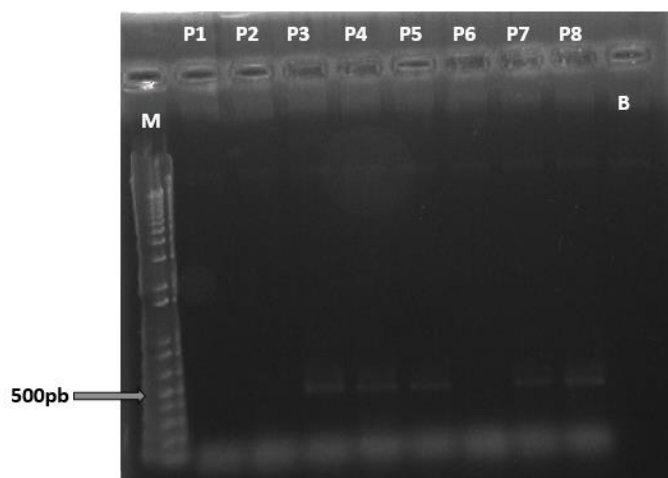


Figura 7. Amplificación de 5 muestras de ADN con los primers CaInt2, ITS4; correspondiente a la especie de *C. acutatum*, en los cantones Gualaceo y Guachapala. M: peso molecular B: control. Estas bandas corresponden a las primeras 8 muestras. Gel agarosa al 0.5% en buffer TAE1X, y tinción con bromuro de etidio.

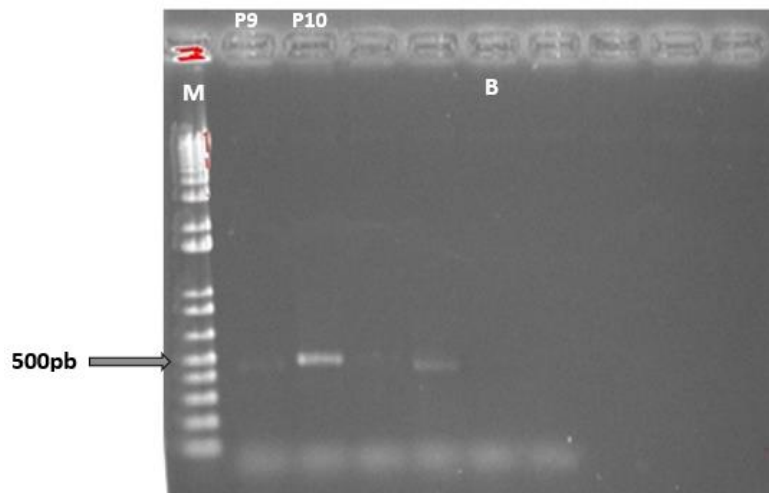


Figura 8. Amplificación de 1 muestra de ADN con los primers CaInt2, ITS4; correspondiente a la especie de *C. acutatum* del cantón Guachapala. M: peso molecular B: control. Estas bandas corresponden a las 2 muestras restantes. Gel agarosa al 0.5% en buffer TAE 1X, y tinción con bromuro de etidio.

5.3.2. Amplificación molecular con los primers CL1F, CL2AR; correspondiente a la especie de Colletotrichum gloeosporioides del cantón Guachapala.

Para la pareja de primers utilizados en la PCR correspondientes para CL1F, CL2AR en la figura 9, se muestra un total de 8 bandas, donde se evidenció amplificación en la banda 6 la cual correspondió a la muestra (G-P6) de ADN amplificada con un peso molecular de 1000 pb. En la figura 10 se muestra un total de 5 bandas, las cuales se evidencio amplificación de 1 banda correspondiente a la muestra (G-P10) de ADN amplificadas con un peso molecular de 500 pb, este proceso se realizó con un gel de agarosa al 5% al ser teñidas con bromuro de etidio.

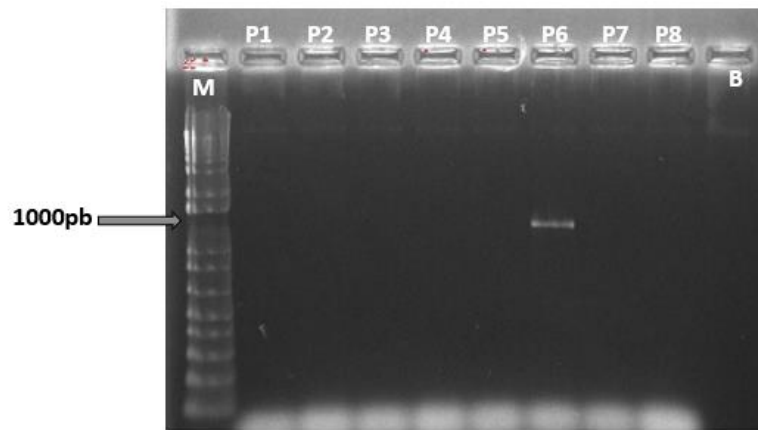


Figura 9. Amplificación de 1 muestra de ADN con los primers CL1F, CL2AR; correspondiente a la especie de *C. gloeosporioides* del cantón Guachapala. M: peso molecular B: control. Estas bandas corresponden a las primeras 8 muestras. Gel agarosa al 0.5% en buffer TAE 1X, y tinción con bromuro de etidio.

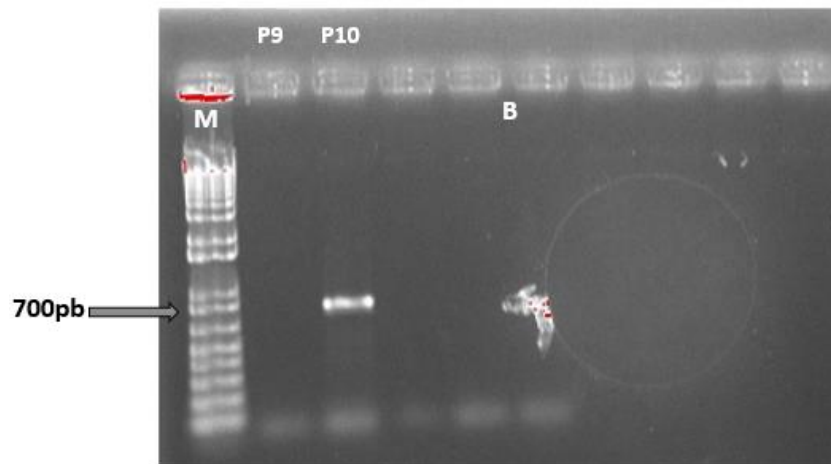


Figura 10. Amplificación de 1 muestra de ADN con los primers CL1F, CL2A; correspondiente a la especie de *C. gloeosporioides* del cantón Guachapala. M: peso molecular B: control. Estas bandas corresponden a las 2 muestras restantes. Gel agarosa al 0.5% en buffer TAE 1X, y tinción con bromuro de etidio.



6. DISCUSIÓN

Con los resultados expuestos en la investigación, se determinó que los hongos responsables de la antracnosis en chirimoya, forman un complejo entre *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* en el cantón Guachapala, mientras que en el cantón Gualaceo se atribuye que el patógeno causante de la enfermedad pertenece a la especie *C. acutatum*. En cuanto a las pruebas de patogenicidad de los frutos que fueron inoculados mediante el método de herida, mostraron que la mayoría de los aislados fueron patógenos para el fruto de chirimoya.

El micelio del hongo se caracterizó por presentar una tonalidad desde blanca hasta color gris oscuro, ligeramente algodonoso y otras muestras abundantemente algodonoso para *C. gloeosporioides*, comparando con estudios realizados por Pérez, Saquero, & Beltrán (2003), encontraron que el micelio del hongo *C. gloeosporioides* se caracterizó por ser esponjoso y denso, mostrando una coloración que varía entre blanco con valores de 90.6% y crema un 9.4%. Esta descripción se asemeja a lo descrito por Villanueva, et al., (2005), quienes relatan que el color del micelio del hongo *C. gloeosporioides* puede variar desde blanco hasta el gris oscuro, sin embargo, en base a estudios realizados por Chowdappa, Subhash, Kumar, Rao, & Rawal (2009) encontraron que el hongo *C. gloeosporioides* forma colonias de fenotipo gris, así como también Montero, et al., (2010), mencionan que el micelio del hongo presenta inicialmente un centro de color gris oscuro, esto puede ocurrir porque una de las características principales del género *Colletotrichum* es la atenuación del color a medida que aumenta la edad del cultivo (Pérez, Saquero & Beltrán, 2003).

Otros estudios muestran que el micelio de *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. orbiculare*



puede ser poco denso hasta denso y aéreo, del mismo modo, las tres especies presentan micelioblanco o blanquecino al inicio y este puede ir cambiando de color desde salmón-rosanaranja, hasta gris (Villanueva, et al., 2005).

Barquero, Peres & Arauz, (2013), exponen en sus resultados que existe una variabilidad morfológica considerable en los aislados de *Colletotrichum* spp. y pueden cambiar su morfología en distintos medios de cultivo o al envejecer, así también, concluyen que fenotípicamente *C. acutatum* puede presentar una coloración que va desde blanco, blanco cremoso hasta anaranjada casi roja, sin embargo, también mencionan que puede confundirse con *C. gloeosporioides* al presentar caracteres similares. Atribuyen que, la morfología de las colonias de *Colletotrichum* spp. se debe establecer según el cultivo, debido a la variabilidad que existe en cada hospedero.

Todo lo expuesto puede deberse a que los datos de coloración pueden variar según el tiempo en el que son tomados, mientras que otros autores afirman que la variabilidad de la morfología de las colonias depende de cada hospedero (Barquero, Peres, & Arauz, 2013), como también al medio o sustrato que se utilice, al igual que a las diferentes temperaturas a las cuales se sometan.

En investigaciones realizadas por Angel, et al., (2017), se aislaron cepas de *Colletotrichum* de aguacate y obtuvieron como resultado que *C. gloeosporioides* presenta un crecimiento rápido, micelio color blanco crema, abundante y algodonoso, las masas conidiales son escasas de color salmón y negras, con una distribución concéntrica, concordando con la muestra G-P10 en donde se pudo mostrar que las cepas de *Colletotrichum* aisladas de chirimoya, presentan las



mismas características morfológicas en cuanto al crecimiento de la colonia y las características del micelio.

Chowdappa, et al., (2009), relatan que el hongo *C. gloeosporioides* presenta un crecimiento rápido, mientras que Montero, et al., (2010), menciona que el hongo presenta una velocidad de crecimiento variable. Los resultados muestran que las colonias de *C. gloeosporioides* tienen un crecimiento rápido alcanzando un máximo de crecimiento de 33 mm/día en la muestra G-P6 , mientras que la muestra G-P10 presenta un crecimiento relativamente lento en comparación con la anterior con un crecimiento máximo de 11 mm/día, según lo descrito por Pérez, et al.,(2003), estas variaciones en el crecimiento de los aislados puede deberse al medio o sustrato que se utilice, al igual que a las diferentes temperaturas a las cuales se sometan.

En cuanto a la morfología de los conidios los aislados presentaron tres formas, la primera dos extremos agudos, la segunda un extremo agudo y otro redondeado y la tercera dos extremos redondeados, según Oliveira, et al., (2005), la primera y la segunda descripción corresponde a *C. acutatum*, y la última a *C. gloeosporioides*, estos resultados coinciden con lo descrito en esta investigación donde la forma de los conidios con dos extremos agudos fue atribuida a la especie *C. acutatum*.

La forma que presenta los extremos de los conidios es una de las características morfológicas más relevantes en la taxonomía de especies de *Colletotrichum*. Rojo, et al., (2005) describe a los conidios de *C. gloeosporioides* de forma ovoide. Contrarrestando el presente estudio, Morales, et al., (2009) concluyen que los conidios de *Colletotrichum* aislados de aguacate eran cilíndricos, y otros de forma oval y elipsoide-fusiforme, atribuyendo estas características solamente a la especie *C. gloeosporioides*. Sin embargo, se evidenció que los



conidios con dos extremos redondeados pertenecen a la especie *C. gloeosporioides*, las otras descripciones mencionadas por los autores están definidas para otra especie de *Colletotrichum*, tales como forma elipsoide de los conidios que es una característica de *C. acutatum*.

C. gloeosporioides es la especie con mayor número de hospedantes y a su vez presenta variaciones morfológicas en cada hospedante, Torres, Tapia, Higuera, & Perez, (2013), mostraron que estas variaciones pueden darse incluso en el mismo hospedante al identificar seis morfotipos distintos de *C. gloeosporioides* en papaya.

La caracterización morfológica que se utilizó no esclareció de la mejor manera la especie responsable de la antracnosis en chirimoya, debido a que existen muchos factores que pueden interferir en la interpretación de los resultados, la utilización de la región ITS del ADNr en especies y clados de los complejos *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, las secuencias de la región ITS del ADNr no pueden diferenciar aislamientos de la especie *C. tropicale* de aislamientos de la especie *C. siamense*, del mismo modo no puede distinguir entre las especies *C. fruticola* y *Colletotrichum aeschynomenes* (Weir, et al., 2012). Según Gañán, Álvarez, & Castaño, (2015), para una mejor interpretación de resultados se debe utilizar la región ITS con genes de identificación específicos, un sistema de identificación eficaz debe contemplar la utilización de la región ITS, así como de genes alternativos conservados pero variables, por ejemplo, para el complejo *C. acutatum* los dos genes de identificación más importantes son el TUB2 y el GAPDH (Cannon, et al., 2012).

Dentro de la caracterización molecular del patógeno donde se utilizó primers definidos de ITS4, Calnt2, CL1F, CL2AR sobre las 10 muestras de ADN del hongo *Colletotrichum*, se obtuvo resultados positivos a la amplificación de las bandas que dan como resultado que las



especies responsables de la antracnosis en chirimoya son *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, comparando con estudios realizados por Villanueva, Yáñez y Hernández (2008), donde utilizaron MEX-1, MEX-3, MICH-1 y MICH-3 de *C. gloeosporioides*, MICH-2 de *C. fragariae*, y MEX-2 de *C. orbiculare*. Para la caracterización molecular del hongo, los autores reportaron que más de una especie es la causante de la antracnosis en chirimoya y muestran que *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. orbiculare* es el complejo de especies responsables esta enfermedad. En el presente estudio se encontró también a *C. acutatum* como agente causal y se concuerda con la presencia de *C. gloeosporioides*.

Por otro lado Villanueva , et al, (2005), reportan en sus estudios que, al utilizar primers ITS1 e ITS4 del aislamiento MICH-2 de *C. fragariae*, determinaron mediante la amplificación positiva que este hongo es el causante de la antracnosis en chirimoya, sin embargo, también mencionan que *C. fragariae* es una subpoblación de *C. gloeosporioides*, con una similitud genética de 95 a 98% entre ambas especies, mencionan también que algunas técnicas moleculares no son efectivas cuando se trata de identificar subespecies y concluyen que es *C. fragariae* el causante de la antracnosis en chirimoya, difiriendo a los resultados descritos en la presente investigación, en donde se constató *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* como responsables de la enfermedad.

Domínguez, et al, (2012), exponen que *Colletotrichum* spp. presenta una gran variabilidad tanto genética como molecular ocasionando que el grado de daño sea variable, según lo reportado en sus estudios los signos de la antracnosis comienzan aparecer en el tercer y cuarto día, posterior a la incubación y va aumentando conforme el fruto va madurando. Concordando con lo observado en las pruebas de patogenicidad en el presente trabajo donde se observó



signos de antracnosis en a partir del día 5 teniendo una relación directamente proporcional con el transcurso de los días y maduración del fruto.



7. CONCLUSIONES

De acuerdo al trabajo realizado se llega a las siguientes conclusiones:

La caracterización morfológica no reveló con precisión las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis en chirimoya.

Las variables: coloración de la colonia, tipo de micelio y crecimiento del micelio, no pudieron mostrar de manera explícita la especie del patógeno causante de la antracnosis en chirimoya, debido a las contradicciones entre criterios de los autores y los resultados encontrados en la investigación.

La variable forma de los conidios, importante para clasificación morfológica de hongos, estableció que en el cultivo de chirimoya existen dos especies que son patógenos para esta especie, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.

En cuanto al análisis molecular PCR se determinó que el cantón Guachapala existe un complejo de especies causantes de la antracnosis en chirimoya correspondientes a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, mientras que en el cantón Gualaceo se atribuyó una sola especie *C. acutatum* como la causante de la enfermedad.

Los frutos inoculados con el hongo *Colletotrichum* spp. mostraron signos típicos de antracnosis a partir del día 5.



8. RECOMENDACIONES

Realizar inoculaciones en frutos y hojas de chirimoya con muestras de cada especie del hongo *Colletotrichum* spp. encontrado tras una caracterización tanto morfológica como molecular y observar si existe diferencias en la sintomatología que presenta la enfermedad correspondiente a cada especie.

Realizar una caracterización morfológica tomando en cuenta más caracteres morfológicos de los hongos, para poder diferenciar de manera más clara la especie causante de la antracnosis en chirimoya.

Realizar un análisis molecular probando otros primers específicos para *Colletotrichum* spp. debido a la gran diversidad de especies que presenta este género.



9. BIBLIOGRAFÍA

- Andino, J. (2014). Determinación de la eficiencia de cuatro niveles de flores polinizadas, utilizando métodos de polinización manual, en chirimoya (*Annona cherimola* Mill), Guachapala-Azuay-Ecuador. Tesis de Ing. Agr. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Angel, T., Valle, F., Ulloa, J., Ramírez, J., Ragazzo, J., Calderón, M., & Bautista, P. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. Causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*.
- Arboleda, A. (2007). Antracnosis de tomate de árbol. *BAYER*.
- Barriga, L. (2012). EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *Colletotrichum acutatum* DE POBLACIONES DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betceum* Cav) EN ESTADO DE PLÁNTULA.
- Barquero, M., Peres, N., & Arauz, F. (2013). Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa rica y Florida (Estados Unidos. *Agronomía Costarricense*.
- Caicedo, O., & Higuerra, B. (2007). Inducción de Polifenoloxidasas en frutos de lulo (*Solanum quitoense*) como respuesta a la infección con *Colletotrichum acutatum*. *Acta Biológica Colombiana*, 12(2), 41-54.
- Camero, C., Luna, G., Ríos, C., Heredia, M., Palomera, M., Betancourt, A., & Campos, O., (2019). Agentes causales de la pudrición de fruto de. *BioCiencia*, 10-11.



- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., Weir, B. S. 2012. *Colletotrichum*- current status and future directions. *Studies in Mycology*. 73(1): 181-213
- Cárdenas, D. (2010). Identificación molecular y caracterización genética y patológica de *Colletotrichum* spp. aislados de naranjilla (*Solanum quitoense*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y chirimoya (*Annona cherimola* Mill) provenientes de zonas productoras de Ecuador.
- Castro, P., Bravo, C., Aníbal, C., Quillay, N., Ramón, M., Belesaca, I., & Díaz, L. (2019). Caracterización morfológica y molecular del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol en Azuay y Loja. *Bosques Latitud Cero*, 8-9.
- Cerón Rincón, Laura E., Higuera M., Blanca L., Sánchez N., Jimena, Bustamante, Silvia & Buitrago, Gustavo. (2006). Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* durante su cultivo en medios líquidos. *Acta Biológica Colombiana*, 11 (1), 99-109.
- Damm, U., Cañón, P., Woudenberg, J., & Crous, P. (2012). El complejo de especies *Colletotrichum acutatum*. *Studies in Mycology*. 73, 37-113.
- Diz, O. (2020). TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. NPunto.
- Dominguez, I., Mohali, S., Marín, M., & Pino, H. (2012). Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology*.



- Farrera, R., A. Zambrano y F. Ortiz. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Rev. Fac. Agron.*
- Galvis, F., & Carrillo, M. (2014). Identificación y Caracterización Molecular de Aislados de *Burkholderia glumae*, Agente Causante del Añublo Bacterial en el Cultivo de Arroz. *Información Tecnológica.*
- Gañán, L., Álvarez, E., & Castaño, J. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *La Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.*
- Garcés, A., & Saravia, K. (2008). *UCV*. Obtenido de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_3_Taxonom%C3%ADa.pdf
- Giraldo Marroquín, Natalia, & Bustamante Rodríguez, Silvia Lizette, & Pinzón Gutiérrez, Yeimy Alexandra, & Buitrago Hurtado, Gustavo (2016). Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de plantas de ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando la técnica “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVIII (1),95-103.
- Gironés, A., Baenas, N., Villaño, D., & Moreno, D. (2014). Iberian-America Fruits Rich in Bioactive Phytochemicals for Nutrition and Health.
- González Vega, María Esther. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 52-63.



- Gunnell, P. S., and W. D. Gubler. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia* 84:157-165.
- Lalangui, K. (2015). Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum* spp., en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en la sierra ecuatoriana. Tesis de grado. Universidad Central del Ecuador.
- Landero-Valenzuela, Nadia, Lara-Viveros, Francisco Marcelo, Andrade-Hoyos, Petra, Aguilar-Pérez, Luis Alfonso, & Aguado Rodríguez, Graciano Javier. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp.
- López-Navarrete, M. (2018). Uso de fungicidas y tratamiento térmico postcosecha para control de antracosis en frutos PAPAYA MARADOL. *Agro Productividad*, 4(3).
- Mafacioli, R., Tessmann, D., Figueiredo, Á., & Batista, J. (2006). Characterization morpho-physiological and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from peach palm. *Summa Phytopathologica*.
- MAGAP. 2010. II Censo agropecuario 2000, Ministerio Agricultura y Ganaderia (MAG). (MAGAP, Editor, G. N. Ecuador., Producer, y MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganaderia, Ambiente y Pesca)) Recuperado 12 marzo 2012 de www.magap.gob.ec.
- Mills, P., Hodson, A., & Brown, A. (1992). Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*.



- Montero, V., Morales, J., Gonzáles, M., Anaya, J., Corona, T., & Gálvez, A. (2010). Genetic, pathogenic and morphological diversity of fungi *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) from Michoacan, Mexico. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*.
- Montri, P., Taylor, P. W. J., y Mongkolporn, O. (2009). Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the causalagent of chili anthracnose, in Thailand. *Plant Dis.* 93,17-20
- Morales, J., Azpíroz, H., & Pedraza, M. (2009). Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Michoacán, México. *Revista Científica UDO Agrícola*.
- 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
- Oliveira, R., Moral, J., Bouhmidi, K., & Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo.
- Oliveria, R., Moral, J., Bouhmidi, K., & Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas*.
- Pérez, L., Saquero, M., & Beltrán, J. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* spp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* spp. *Revista Colombiana de Biotecnología*.



- Pineda, A., & Aragón, K. (2014). Plan de negocios para la creación de una empresa elaboradora y comercializadora de compotas a base de chirimoya para los niños de doce meses a tres años, destinado al consumo local y con apertura al mercado canadiense.
- Rodríguez-López, Edgar Saúl, González-Prieto, Juan Manuel, & Mayek-Pérez, Netzahualcoyotl. (2009). La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista mexicana de fitopatología*, 27(1), 53-63.
- Rojo, I., Álvarez, B., García, R., León, J., Sañudo, A., & Allende, R. (2007). Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista mexicana de fitopatología*.
- Ruiz, E., Mejía, M. Á., Alejo, J., Valencia, A., & Reyes, A. (2014). Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*.
- Saldarriaga, A., Castaño, J., & Arango, R. (2008). Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora.
- Sandoval, Noelting, & Cristobal. (2008). Comunicación corta *Colletotrichum gloeosporioides*. Primera notificación como agente causal de la muerte regresiva de *Rosmarinum officinalis* L en Buenos Aires, Argentina. *American Medical Assoc*, 54-58.
- Sáyago, S., & Álvarez, E. (2018). Alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados.



- Smith, B. J. and L. L. Black. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis.* 74: 69-76.
- Sreenivasaprasad, S., Brown, A., & Mills, P. (1992). AND sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.
- Tacán, M. (2007). Caracterización agromorfológica e identificación de zonas potenciales de conservación y producción de guanábana (*Annona muricata*) y chirimoya (*Annona cherimola*) en fincas de agricultores y condiciones ex situ en Costa Rica
- 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.
- Torres, C., Tapia, R., Higuera, I., & Perez, D. (2013). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology*.
- Tovar, A., Hernández, M., Cristóbal, J., Romero, R., & Mora, G. (2001). Escala Logarítmica Diagramática de la Severidad de la Mancha Negra (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*.
- Urdaneta, L., Sanabria, M., Rodríguez, D., & Pérez, M. (2013). Antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* Simmonds en frutos de fresa en los estados Lara y Trujillo, Venezuela. *Fac. Agron. (LUZ)*.



- Vanegas, E., Encalada, C., Feicán, C., Gómez, M., & Viera, W. (2016). Cianamida Hidrogenada y Nitrato de Potasio Para Manipular Épocas de Cosecha en Chirimoya (*Annona Cherimola* Mill). Ecuador es Calidad, 3:31-37.
- Velázquez, A., García, S., Robles, L., Nava, C., & Nieto, D. (2018). Primer reporte del género *Colletotrichum* spp. en frutos de pimienta gorda (*Pimenta dioica*) en Veracruz, México. Revista mexicana de fitopatología.
- Villanueva, R., Hernández, A., Yáñez, M., Téliz, D., Mora, A., Cárdenas, E., & Castañeda, Á. (2005). Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. Agrociencia.
- Villanueva, R., Cárdenas, E., Hernández, A., Mora, A., & Ortiz, D. (s.f.). Agrociencia. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/302/30240609.pdf>
- Villanueva, R., Yáñez, M., & Hernández, A. (2008). Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). Agrociencia.
- Wharton, P., & Diéguez, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*. 73 (1): 115-180.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications.



Xie, L., J. Zhang, Y. Wan y D. Hu. 2010. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang province and Shanghai city, China. J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)



10. ANEXOS

Anexo 1. PROTOCOLO DE MICROEXTRACCIÓN DE ADN (Fulton y Tanksley 1995).

- Preparar el tampón de micropreparación justo antes de la extracción de ADN (mezcla viscosa):
- 25 ml de tampón de extracción (el tampón debe estar a temperatura ambiente al momento de hacer la mezcla con las otras soluciones).
- 25 ml de tampón de lisis de núcleos
- 10 ml de sarcosyl 5%
- 0,2 g de bisulfito de sodio para 60 ml de tampón de micropreparación
- Tomar el material vegetal en un tubo eppendorf de 1,5 ml (8 a 20 mg de hoja dependiendo de la especie vegetal)
- Adicionar 100 µl de tampón de micropreparación y triturar con la ayuda de un pistón.
- Cambiar el pistón para cada muestra o lavarlo con agua destilada entre cada triturado.
- Adicionar 300 µl de tampón de micropreparación. Agitar ligeramente al vortex.
- Incubar a 65 °C, de 30 a 120 min.
- Llenar el tubo con la mezcla Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) en la sorbona. Agitar al vortex o dando la vuelta el tubo (de 50 a 100 veces).
- Centrifugar 5 min a 10 000 rpm
- Recuperar la fase superior en un nuevo tubo de 1,5 ml y adicionar 400 µl de isopropanol frío o 800 µl de etanol al 95%. Mezclar hasta la precipitación del ADN.



- Centrifugar 5 min a 10 000 rpm
- Eliminar el isopropanol y lavar el pelet con 400 μ l de etanol 70% frio. En este estado el ADN puede ser conservado a -20 °C indefinidamente.
- Eliminar el etanol y colocar los tubos en papel absoerbente. Dejarlos al menos 1 hora o en vacio 15 min.
- Adicionar 50 μ l de TE. Guardar a 4 °C una semana o a -20 °C para un almacenaje más largo.

Anexo 2. Fotografías de la fase de laboratorio

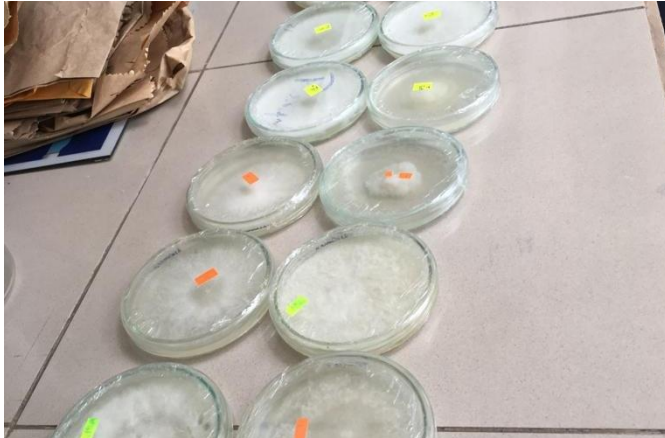


Foto 1. Aislamiento del hongo Colletotrichum spp.



Foto 2. Caracterización morfológica de las muestras.



Foto 3. Análisis molecular PCR.



Foto 4. Desinfección de los frutos de chirimoya.



Foto 5. Inoculación del hongo *Colletotrichum* en los frutos de chirimoya.

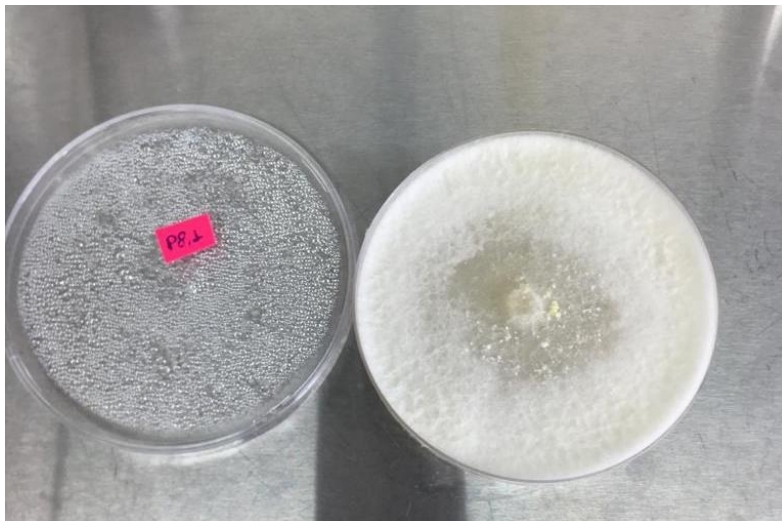


Foto 6. Aislamiento *C. acutatum* día 7.



Foto 7. Aislamiento *C. gloeosporioides* día 7.



Foto 8. Aislamiento *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* día 25.