

Caracterización Morfológica, Patológica y Molecular de la Antracnosis (*C. acutatum*) del Tomate de Árbol y Chocho

Liliana E Pinto Tafur¹

Carla A Tiaguaro Herrera²

César E. Falconí Saá³

^{1,2,3} Escuela Politécnica del Ejército – Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias - IASA I

Sangolquí, Ecuador

¹lili87eli@hotmail.com

²carla_tiaguaro@hotmail.com

³cefalconi@espe.edu.ec

Resumen— En Ecuador los cultivos de tomate de árbol y chocho presentan elevadas pérdidas en su producción a causa de la antracnosis que se creía era ocasionada por varias especies del género *Colletotrichum*. En este estudio se identificó a *Colletotrichum acutatum* como la causa de la antracnosis en los dos cultivos mediante características morfológicas, pruebas patogénicas y moleculares. El color y tamaño de la colonia, el tamaño y forma de la conidia se consideraron dentro de las pruebas morfológicas. Los aislamientos de chocho presentaron un color verde oliva en sus colonias, por su parte las de tomate de árbol fueron salmón- anaranjado. La forma de la conidia de aislamientos de los dos cultivos fue fusiforme variando de 15.0-16.3 x 5.7- 6.9µm en chocho y 14.07- 16.03 x 6.1- 6.9µm en tomate de árbol característica de *C. acutatum*. Para la identificación molecular de *C. acutatum* se utilizó cebadores específicos para *C. gloeosporioides* (CgInt) y para *C. acutatum* (CaInt2), en combinación con el cebador universal ITS4. Esto confirmó que el agente causal de la antracnosis del chocho y tomate de árbol es *C. acutatum*. La filogenia de *C. acutatum* se estudió en base a secuencias de la regiones ITS1-ITS2 del ADN ribosomal determinando que la población de chocho es diferente de la tomate de árbol. Pruebas de patogenicidad inoculando aislamientos de los dos cultivos en tallos de tomate de árbol y chocho demostraron infección cruzada, mostrando la habilidad de los aislamientos para infectar a los dos hospederos, con diferente grado de virulencia.

Palabras clave: *Colletotrichum acutatum*; chocho; tomate de árbol; antracnosis, caracterización molecular y patológica.

I. INTRODUCCIÓN

La antracnosis del tomate de árbol causada por el hongo *C. gloeosporioides*, es la enfermedad más importante en la producción frutícola a nivel mundial y nacional, debido a la severidad de la enfermedad, a la magnitud de las pérdidas que causa tanto en producción, disminución en la calidad de la fruta al momento de la cosecha y a su difícil control [1].

Al igual que el tomate, el chocho es susceptible a esta enfermedad. La antracnosis causada por *Colletotrichum* spp causa pérdidas de hasta del 100% [2]. El patógeno habita en la semilla, pero luego se traslada a la plántula y entonces a la planta afectando en la producción y calidad del grano [3].

En la serranía ecuatoriana es común observar plantaciones conjuntas de chocho y tomate de árbol, afectadas por la antracnosis. Recientes estudios han demostrado que aislamientos de *C. acutatum* obtenidos de plantas de chocho fueron patogénicos al inocular a frutos tomate de árbol y viceversa [4].

En Ecuador, se carece de información clara sobre la o las posibles especies de *Colletotrichum* spp. y la taxonomía de estos patógenos causantes de la antracnosis en chocho y tomate de árbol. Un reciente estudio usando rasgos morfológicos, cebadores específicos y secuencias de la región interna ribosomal - cadena de reacción de polimerasa (ITS-PCR) y aspectos patológicos caracterizó al agente causal de la antracnosis de estos dos hospederos como *C. acutatum* [4]. Las metodologías consideradas en este estudio para la identificación morfológica, patológica y molecular de *C. acutatum* o *C. gloeosporioides* se basaron en estos hallazgos recientes.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios morfológicos y moleculares se desarrollaron en los laboratorios de Fitopatología y Control Biológico y los estudios de patogenicidad sobre plantas chocho o tomate de árbol en un invernadero de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias – IASA-I, ubicada en la Hacienda el Prado, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando.

A. Caracterización Morfológica

Se aislaron muestras de *Colletotrichum* spp de tallos, vainas y semillas de chocho (*L. mutabilis*) y frutos de tomate de árbol (*S. betaceum*) con síntomas característicos de la enfermedad, colectadas en tres diferentes localidades, de las provincias de Imbabura, Tungurahua y Chimborazo. Cada muestra se etiquetó con el nombre del lugar y la localización geográfica.

Para aislar el patógeno se cortaron fragmentos infectados, se lavaron con agua corriente por 10 min., tres lavados de 1 min con hipoclorito de sodio 0.5% y uno con agua estéril por 1 min. Los fragmentos desinfectados de chocho o tomate de árbol se sembraron separadamente en cajas Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) más sulfato de estreptomina (250 µg ml⁻¹). Las cajas se incubaron a 25°C

por 10 días. De las colonias que mostraron crecimiento y morfología típica de *Colletotrichum* sp., se confirmó la forma de conidia y cuerpo fructífero al microscopio y se transfirieron a nuevas cajas Petri con PDA más estreptomycin, hasta obtener cultivos puros.

Para obtener cultivos monospóricos se suspendió 1×10^4 esporas/ml de cada aislamiento en solución salina (NaCl 0.5%) más Tween 80 (0.1%). De esta suspensión se tomó con una alícuota con una aza de transferencia y se estrió en una caja Petri con Agar agua. Mediante un estereomicroscopio se identificaron esporas individuales de *Colletotrichum* sp., de cada aislamiento, la cual se extrajo con un sacabocado y se sembró en una nueva caja Petri con medio PDA, tres cajas por aislamiento. Estas cajas se incubaron a 25°C durante 10 días.

La descripción macroscópica del color de la colonia en el haz y envés de la caja Petri, tamaño y aspecto del micelio forma y tamaño de la conidia se cuantificó en aislamientos de 10 días. Esta última variable se determinó mediante un microscopio óptico, mediante un ocular micrométrico, calibrado para el lente de mayor aumento.

De los cultivos monospóricos, se colectaron esporas en agua y las suspensiones se adhirieron a rodajas de papel filtro esterilizado, colocadas en viales y almacenadas a -20 °C.

B. Caracterización Molecular de la antracnosis

Cinco cultivos monospóricos de chocho y 5 de tomate de árbol se sembraron en medio PDA e incubaron por 5 días a 25 °C [5].

La extracción de ADN se realizó mediante un kit de extracción comercial EZNA Fungal DNA (Omega Biotek, Doraville, USA), tomando como base el procedimiento del fabricante con las siguientes modificaciones: 1. Triturar (muy bien) aproximadamente 100mg del micelio con ayuda del nitrógeno líquido. 2. Añadir 600ul de Tampón FG1 (añadir 5ul de RNase 20mg/ ml y 10ul de 2-mercaptoethanol). 3. Poner a incubar a 65° C durante 10 min. Mezclar mediante inversión del tubo. 4. Añadir 140ul de Tampón FG2 (vortex). 5. Centrifugar 10000 x 10min. 6. Recoger 600ul en un nuevo tubo eppendorf. 7. Añadir 300ul de Tampón FG3. 8. Añadir 600ul de etanol absoluto (vortex). 9. Ponerlo en una columna (2 veces). 10. Centrifugar 10000 x 1min. 11. Lavar con 750ul de Wash Buffer (repetir 2 veces). Centrifugar 10000 x 1min. 12. Centrifugar a máxima velocidad x 2min para secar la columna. 13. Transferir a otro tubo eppendorf y añadir 100ul de agua a 65° C (FRACCIÓN A). 14. Para incrementar la concentración de DNA, poner el agua e incubar la columna 5min a 65° C. 15. Esperar 1min y centrifugar a 10000 x 1min. 16. Volver a recoger con 100ul de agua a 65° C. (FRACCIÓN B).

El buffer madre para electroforesis TAE 10X por 1 litro constó de: Tris base (48.40g), NaOAc (4.10g), Na₄EDTA (2.92g). De este se diluye a TAE 1X que se usó para electroforesis. Las muestras de ADN se visualizaron en agarosa al 0.8% en TAE (Tris-acetate-EDTA)1X. Cada muestra contuvo 1µl Blue Juice y 4µl de cada muestra de DNA. La migración se realizó a 100 Voltios por 1 hora. Como peso molecular estándar se utilizó un marcador comercial de 100 bp (INVITROGEN).

Para detectar los fragmentos de DNA se utilizó una solución de TAE 1X con Bromuro de Etidio al 0,05%, bajo una lámpara de luz ultravioleta, en un foto documentador (LMS-20F).

El DNA de los aislamientos de chocho y tomate de árbol se amplificó usando cebadores de diagnóstico específicos para *C. gloeosporioides* (CgInt) y *C. acutatum* (CaInt2), en combinación con el iniciador universal ITS4 [5]. El coctel para la PCR estuvo compuesto de buffer 10x, MgCl₂ 50uM, dNTPs 25Um, ITS1, ITS4, CaInt2, CgInt, TAQ, Agua Molecular. Además se añadió un control positivo y un control negativo con agua molecular. El programa para amplificación fue: 1min (95°C), 1min (58°C) y 1min (72°C). Dando un total de 35 ciclos y conservándolo a 4°C.

Para confirmar la filogenia de aislamientos de chocho y tomate de árbol, se realizó otra prueba PCR, usando iniciadores ITS1 e ITS4 con la siguiente programación: 1 ciclo de 2 min a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 1 min a 44°C (anidamiento), 1 min a 72°C (extensión), terminando con 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. Dando un total de 40 ciclos en dos horas y media y conservándolo a 4°C.

Los productos PCR fueron purificados con el kit de purificación UltraClean PCR Clean Up DNA (MoBIO, USA) y secuenciados usando el kit TaqDyeDeoxyTM terminator cycle sequencing (Applied Biosystems, UK), de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un secuenciador de ADN Biosystems automatic modelo 373A. Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis comparativo BLAST incluyendo secuencias rDNA de chocho identificadas en estudios anteriores [4, 5, 6], disponibles en el banco de genes (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). La distancia genética de las secuencias de los aislamientos de *C. acutatum* de Ecuador se calculó mediante un análisis Clustal X, considerando su máxima parsimonia, determinando sus relaciones fenéticas.

C. Obtención de plantas de Chocho y Tomate de Árbol

El sustrato para propagación estuvo compuesto de tierra negra, pomina y fibra de coco en proporción 1:1:1. La semilla de chocho fue desinfectada con NaClO 0.5%. La siembra se realizó en macetas en el sustrato mencionado, 3 semillas por maceta.

Las semillas también se desinfectaron con NaClO 0.5%. La siembra se realizó en platabandas, plántulas de 12-15cm se trasplantaron, una por maceta, en el sustrato antes mencionado.

D. Estudio de rango de hospederos

Quince μl de una suspensión de esporas (NaCl 0.5% + tween80 0.1%) de cada aislamiento y se sembró en cajas Petri con medio de cultivo PDA y estreptomycin (250 μg ml⁻¹). Las cajas Petri se incubaron a 25°C durante 8 días, realizando la colecta de esporas y calibrando a una concentración de 1×10^5 conidias/ml mediante un hematocitómetro.

Con una aguja hipodérmica se realizaron dos heridas en los tallos de tomate de árbol y una herida en los 3 tallos de plantas de chocho, donde se inoculó 15 μl de la suspensión de conidias de cada aislamiento.

Para evaluar la reacción de las plantas se usó una escala de severidad: 1 = la inmunidad, sin ningún tipo de lesión o arruga de folíolos, 2 = lesiones muy pequeñas en hojas (menos de 2 mm), esporulación ausente esporádica y localizada, 3 = zona apical del tallo central se duplica debido a la infección, poca esporulación, 4 = presencia de lesiones medianas (2-5 mm) en la región meristemática o en el punto de lesión que se realizó, acompañado de poca esporulación 5 = presencia de lesiones (más de 5 mm) sobre el tallo principal o en la zona de meristemas con tejido necrótico, acompañado por el colapso de los tejidos (esporulación abundante), 6 = plantas severamente afectadas y necróticas, o plantas muertas. Escala de antracnosis con apariciones en las plantas (1-2 reacción incompatible - reacción resistente, 3-6 reacción compatible - reacción susceptible) [4].

Se realizó un re-aislamiento del hongo de tallos de chocho y tomate de árbol para confirmar que los aislamientos efectivamente pertenecían a *C. acutatum*.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Diámetro y Área de la Colonia de *C. acutatum* procedente de Chocho y Tomate de Árbol

Al analizar el diámetro de la colonia para aislamientos de chocho “Fig. 1” como para aislamientos de tomate de árbol “Fig. 2” se determinó que en todos los casos el tamaño de la colonia no fue superior a 48mm de diámetro ni menor a 45mm, luego de 8 días a 25°C de incubación. Este rango coincide con observaciones realizadas por Talhinhos et al. [5], quienes establecieron el tamaño de la colonia en *C. acutatum*. En el mencionado estudio Talhinhos et al. (2002) formaron un primer grupo con aislamientos de *Lupinus* spp, cepas de referencia de *C. acutatum* y otras de otros hospederos, de crecimiento lento con promedio entre 30.0 a 45.2mm de diámetro, y un segundo grupo formado por

aislamientos de cítricos y cepas de referencia de *C. gloeosporioides*, de crecimiento rápido con un promedio entre 50.2 a 70.3mm de diámetro de la colonia.



Figura 1. Morfología de colonias de *C. acutatum* procedente de tomate de árbol



Figura 2. Morfología de colonias de *C. acutatum* aisladas de chocho



Figura 3. Colonia de *C. acutatum* aislada de chocho

B. Color de la Colonia de Aislamientos de Chocho y Tomate de Árbol

Según Talhinhos et al. [5], los aislamientos de *C. acutatum* presentan diversas coloraciones, densidades y texturas que generalmente varía entre salmón rosado, naranja, carmín, ocre o verde oliva, dependiendo de su hospedero. En cambio las colonias de *C. gloeosporioides* presentan coloraciones crema, gris o plomo. En esta investigación el color de la colonia que prevaleció en los aislamientos de chocho “Fig.

3” fue verde oliva gris, mientras que el color de la colonia en los aislamientos de tomate de árbol “Fig. 4”, varió de anaranjado a salmón.

C. Tamaño de Conidias de Aislamientos de Chocho y Tomate de Árbol

Las conidias de aislamientos de chocho tuvieron un rango de 15.0 – 16.33 x 5.7- 6.9µm, mientras que los aislamientos de tomate de árbol variaron desde 14.07 – 16.23 x 6.1- 6.9µm. Estas medidas se relacionan a las de *C. acutatum* descritos por [7], quien indica que las masas de conidias de *C. acutatum* son de color rosado a naranja con un tamaño de 8.5 – 16.5 x 4.5- 6.0µm, mientras el tamaño de las conidias de *C. gloeosporioides* es de 9 – 24 x 3 – 4.5µm.

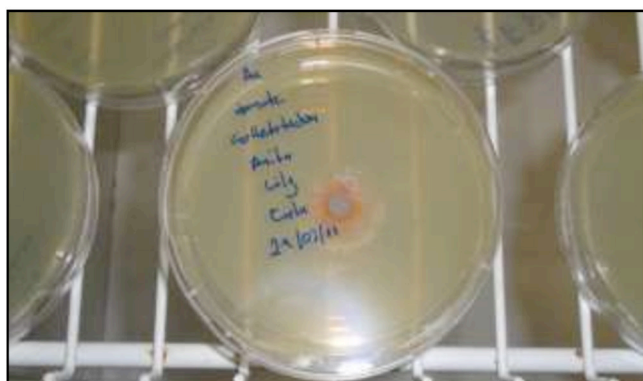


Figura 4. Colonia de *C. acutatum* procedente de tomate de árbol

D. Forma de las Conidias de Aislamientos de Chocho y Tomate de Árbol

Tanto los aislamientos de chocho como los aislamientos de tomate de árbol registraron conidias de forma ovoide con un lado ahusado y el otro redondeado “Fig. 5 y Fig. 6” característico de *C. acutatum* [4]. Talhinhos et al. [5] mencionan que el 40-100% de las conidias fueron ahusados en un extremo y redondeadas en el otro para los aislamientos identificados como *C. acutatum*.



Figura 5. Tamaño y forma de la conidia de *C. acutatum* aislado de chocho



Figura 6. Tamaño y forma de la conidia de *C. acutatum* aislado de tomate de árbol

En otro estudio descrito por Orozco [8], las razas KLA y PFD, de *C. acutatum* registraron una elevada proporción de conidios unicelulares, con un lado fusiforme, mientras que el aislamiento de *C. gloeosporioides*, tuvo conidias unicelulares, cilíndricas con ambos lados redondeados. No existiendo diferencias notables en morfología conidial entre aislamientos de la misma raza.

E. Caracterización Molecular de Poblaciones de *C. acutatum*

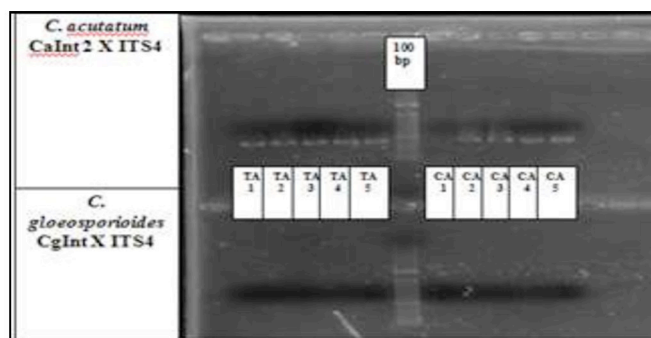


Figura 7. Diagnóstico de 10 aislamientos de *C. acutatum* (5 de chocho y 5 de tomate de árbol) mediante primers específicos CaInt2 y CgInt en combinación con ITS4. Marcador molecular 100bp.

Los 10 aislamientos en estudio reaccionaron positivamente con el cebador CaInt2 específico para *C. acutatum* y negativamente cuando se utilizó el cebador CgInt específico para *C. gloeosporioides* (Figura 7).

La relación filogenética de secuencias ITS1-ITS2 de los 10 aislamientos de *C. acutatum* fue comparada con treinta y dos secuencias de Falconi [4] “Figura 8”. Alta homogeneidad se determinó para secuencias ITS de la antracnosis de chocho de este estudio formado un subgrupo cercano de las secuencias ITS reportadas por Falconi [4]. Además, secuencias rDNA de *C. acutatum* de chocho encontradas por Talhinhos et al. [5] formaron otro grupo independiente. Esto indica que la causa de la antracnosis del chocho en la zona andina es genéticamente diferente de la antracnosis del chocho en Europa, hecho ya reportado recientemente por Falconi [4]. Los 4 aislamientos de

referencia AJ536231 *C. falcatum*, AJ536223 *C. fragariae*, AJ536229 *C. gloeosporioides* y M13906 se encuentran en otros grupos. Los 5 aislamientos de tomate de árbol y los 5 aislamientos de chocho se encuentran formando diferentes subgrupos, indicando una disimilaridad del 0.4% entre ellos. Los 5 aislamientos de tomate de árbol son disimilares apenas en un 0.4% de la secuencia JN543069 de *S. betaceum*.

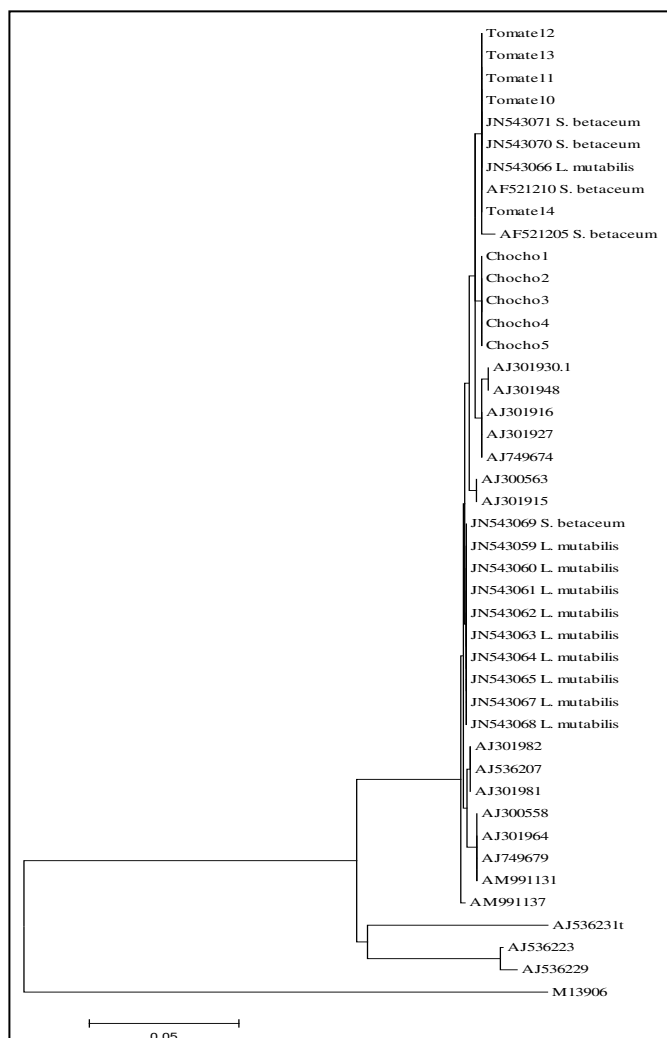


Figura 8. Dendrograma de 10 secuencias ITS- PCR de *C. acutatum* (5 de chocho y 5 de tomate de árbol) comparadas con 32 secuencias ITS- PCR de *C. acutatum* tomados de Falconí C.E. [3].

Tomando en cuenta la poca disimilaridad encontrada entre las secuencias ITS- PCR de *C. acutatum* y las secuencias tomadas de Talhinhos et al. [5] representadas en la “Fig. 8”, podría suponer la fácil adaptación del patógeno a los dos hospederos o una posible adaptación a un mayor rango de hospederos. Orozco [8] indica que la diversidad genética encontrada entre aislamientos de *C. acutatum* puede atribuirse a una respuesta adaptativa a la presión de

selección ejercida por el uso de diferentes hospedantes, lo cual selecciona diferentes genotipos del patógeno.

Los aislamientos de referencia en su mayoría tienen como patógeno causante de la enfermedad a *C. acutatum*, a pesar de que estos provienen de distintos hospederos y países. Esto demostraría que *C. acutatum* es extensivamente patogénico en muchos cultivos [4]. Talhinhos et al. [5] demostraron que aislados tomados de *Ceanothus* y *Eriobotrya* sp tuvieron como referencia a *C. acutatum*, al igual que otros hospederos CR46 de *Vitis* sp., *Magnolia* sp., y el aislamiento CMG12 de canela. Talhinhos et al. [5] sugirieron que la gama de hospederos y epidemiología de los diferentes grupos genéticos dentro de *C. acutatum* debe investigarse más a fondo. *Glomerella acutata*, el teleomorfo de *C. acutatum*, es un potencial recombinante que pueden dar lugar a cepas potencialmente sexuales así como la posterior adaptación a nuevos hospederos.

E. Incidencia de la Antracnosis en el Cultivo de Chocho

En base a la incidencia “Tab. 1” y severidad “Tab. 2” se determinó que la variedad menos susceptible al ataque de antracnosis fue la ECU-722-4. El INIAP [9] evaluó ocho líneas promisorias de chocho (ECU-712, ECU-2716, ECU-2658, ECU-7293, ECU-8415, ECU-722-4, INIAP-ANDINO y línea COTOPAXI), registrando su tolerancia a algunas enfermedades. Una de las líneas seleccionadas fue ECU-722-4 por presentar buena tolerancia a la antracnosis.

TABLA 1. RESPUESTA DE 3 VARIEDADES DE CHOCHO (*L. mutabilis*) SOBRE LA INCIDENCIA DE LA ANTRACNOSIS (*C. acutatum*), LUEGO DE 25 DÍAS DE LA INOCULACIÓN

Variedades	Incidencia (%)
ECU-712-1	81.11 a
F8 (ECU-8415 x ECU-2658)	75.56 ab
ECU-722-4	64.44 b

TABLA 2. RESPUESTA DE 3 VARIEDADES DE CHOCHO (*L. mutabilis*) SOBRE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS, LUEGO DE 25 DÍAS DE LA INOCULACIÓN

Variedades	Severidad (grado x observación)
ECU-712-1	2.71
F8 (ECU-8415 x ECU-2658)	2.66
ECU-722-4	2.40

Las “Tab. 3” y “Tab. 4” muestran la existencia de rango de hospederos cruzados. Los aislamientos de tomate de árbol infectaron plantas de chocho, con menor severidad. Mientras que los aislamientos de chocho infectaron las plantas de chocho con necrosamiento y muerte del tejido.

TABLA 3. EFECTO DE 10 AISLAMIENTOS DE *C. acutatum* SOBRE LA INCIDENCIA A LA ANTRACNOSIS DEL CHOCHO (*L. mutabilis*), LUEGO DE 25 DÍAS DE LA INOCULACIÓN

Tratamientos (aislamientos)	Incidencia (%)
Tom3	37.04 a
Tom5	48.15 ab
Tom4	59.26 abc
Tom2	66.67 bc
Tom1	66.67 bc
Cho3	77.78 cd
Cho5	92.59 d
Cho1	92.59 d
Cho4	96.30 d
Cho2	100.00 d

TABLA 4. EFECTO DE 10 AISLAMIENTOS DE *C. acutatum*, SOBRE LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS LUEGO DE 25 DÍAS DE LA INOCULACIÓN EN EL CHOCHO (*L. mutabilis*)

Tratamientos (aislamientos)	Severidad (grado x observación)
Tom3	1.37 a
Tom4	1.59 a
Tom2	1.78 ab
Tom5	1.78 ab
Tom1	1.85 ab
Cho3	2.48 b
Cho5	2.48 b
Cho4	3.37 c
Cho1	3.82 c
Cho2	5.37 d

Contreras [10], indica que aislamientos caracterizados como *C. acutatum* mostraron patogenicidad cruzada, así las cepas obtenidas de tomate amarillo y tomate rojo, mostraron síntomas en mango, tomate amarillo y rojo, respectivamente. Además una cepa recuperada de tomate rojo produjo síntomas en granadilla, naranjilla, mango y tomate amarillo.

F. Incidencia de la Antracnosis en el Cultivo de Tomate de Árbol

A pesar de que no existe un estudio en el Ecuador sobre el comportamiento de los principales ecotipos de tomate de árbol (*S. betaceum*), al ataque de la antracnosis, se puede apreciar que la variedad común tuvo menor incidencia "Tab. 5" y severidad "Tab. 6". Un estudio realizado por INIAP [11], sobre la determinación del comportamiento de los principales ecotipos comerciales (común, gigante amarillo y gigante mora) de tomate de árbol (*S. betaceum*), al ataque del agente causal de la mancha negra del tronco (*Fusarium solani*; *Phytophthora infestans*), indica que el ecotipo común, presenta el menor tamaño de lesión luego de 60 días de la inoculación, mostrando menor susceptibilidad al ataque de *Fusarium solani*.

TABLA 5. RESPUESTA DE 2 VARIEDADES DE TOMATE DE ÁRBOL (*S. betaceum*), SOBRE LA INCIDENCIA DE LA ANTRACNOSIS, LUEGO DE 25 DÍAS DE LA INOCULACIÓN

Variedades	Incidencia (%)
Común	65.00 a
Gigante común	93.33 b

TABLA 6. RESPUESTA DE 2 VARIEDADES DE TOMATE DE ÁRBOL (*S. betaceum*), A LA SEVERIDAD DE LA ANTRACNOSIS, LUEGO DE 25 DÍAS DE LA INOCULACIÓN

Variedades	Severidad (grado x observación)
Común	1.23 a
Gigante común	1.52 b

Al analizar la incidencia "Tab. 7" y severidad "Tab. 8", se determinó el positivo rango de hospederos, confirmando lo encontrado por Falconi [4], los aislamientos de *C. acutatum* obtenidos de plantas de chocho fueron patogénicos al inocular a frutos tomate de árbol y viceversa.

TABLA 7. RESPUESTA DE 10 AISLAMIENTOS DE *C. ACUTATUM* SOBRE EL DESARROLLO DE ANTRACNOSIS EN EL TOMATE DE ÁRBOL (*S. betaceum*), LUEGO DE 25 DÍAS DE LA INOCULACIÓN

Tratamientos (aislamientos)	Incidencia (%)
Cho4	33.33 a
Cho5	50.00 ab
Tom5	66.67 bc
Tom2	83.33 cd
Tom4	83.33 cd
Cho3	83.33 cd
Tom1	91.67 cd
Cho2	100.00 d
Cho1	100.00 d
Tom3	100.00 d

TABLA 8. RESPUESTA DE 10 AISLAMIENTOS DE *C. acutatum* SOBRE EL DESARROLLO DE ANTRACNOSIS EN EL TOMATE DE ÁRBOL (*S. betaceum*), LUEGO DE 25 DÍAS DE LA INOCULACIÓN

Tratamientos (aislamientos)	Severidad (grado x observación)
Cho4	0.89 a
Cho5	1.00 ab
Tom4	1.28 abc
Tom5	1.28 abc
Cho3	1.33 abc
Cho1	1.44 bcd
Tom1	1.50 bcd
Cho2	1.61 cd
Tom2	1.61 cd
Tom3	1.83 d

En la "Tab. 8" se aprecia que los valores de severidad según la escala propuesta, son relativamente bajos, lo que demostraría que la enfermedad no proliferó luego de 25 días

de la inoculación. Según Martínez et al. [12], al inocular frutos de tomate de árbol con cepas del mismo cultivo se obtuvo una respuesta de infección media a los 30 días de su evaluación, lo que indica que las plantas debieron ser monitoreadas por un lapso más largo de tiempo.

Según Botero [13], la antracnosis en el tomate de árbol ataca frutos en cualquier estado de desarrollo. Los síntomas se manifiestan con mayor frecuencia en el ápice o en los puntos en que varios frutos de un mismo racimo quedan en contacto. En esta investigación este factor pudo ser una limitante en la proliferación de la enfermedad en el tomate de árbol, ya que la inoculación fue hecha en los tallos pero el patógeno es más manifiesto en los frutos. No así en el chocho ya que el tallo representa uno de los órganos más susceptibles [3].

IV. CONCLUSIONES

Al caracterizar morfológicamente los cinco aislamientos de chocho como los cinco aislamientos de tomate de árbol los resultados obtenidos para las variables tamaño y color de la colonia como tamaño y forma de la conidia fueron característicos de *C. acutatum*.

La causa de la antracnosis del chocho y del tomate de árbol en Ecuador es *C. acutatum* en base a la reacción positiva con el cebador CaInt y negativa CgInt, en concordancia con recientes estudios [4].

Los 5 aislamientos de tomate de árbol y los 5 aislamientos de chocho formaron diferentes subgrupos en el dendograma, indicando una disimilaridad de apenas 0.4% entre ellos, esto podría explicar la fácil adaptación del patógeno a los dos hospederos.

En las pruebas de patogenicidad existió rango de hospederos cruzados entre chocho, tomate de árbol y viceversa.

Las tres variedades de chocho ECU-712-1, F8 (8415 x 2658), ECU- 722-4 fueron susceptibles al ataque de antracnosis. La variedad que obtuvo menos susceptibilidad fue ECU- 722-4.

De las dos variedades de tomate de árbol Común y Gigante común la menos susceptible al ataque de la antracnosis fue la variedad Común.

A pesar de que las muestras fueron tomadas de distintas localidades de la serranía ecuatoriana se puede observar que tanto los aislamientos de chocho como de tomate de árbol se encuentran subgrupos cercanos, lo que indica que las poblaciones de *C. acutatum* en el Ecuador son clonales en chocho y clonales en tomate de árbol.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Alarcón, J; Chavarriaga, W. 2007. Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (penz) penz & sacc. En tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. (En línea). Consultado el 17 de septiembre de 2010. Disponible en: [http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/agronomia15\(1\)_6.pdf](http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/agronomia15(1)_6.pdf)
- [2] Murillo A, Rivera M, Peralta E, Mazón N, Vargas F. 2007. Avances preliminares en el mejoramiento genético del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) para resistencia a la antracnosis. INIAP, Ecuador. Memorias del XII Congreso Internacional de Cultivos Andinos, 23-27 de julio. P26.
- [3] Falconí CE. (2012). Assessing anthracnose symptoms in Andean lupin (*Lupinus mutabilis*). In: *Lupinus mutabilis* in Ecuador with especial emphases on anthracnose resistance, Chapter three of Cesar Falconi's PhD Thesis, Plant Breeding Laboratory, Wageningen University – The Netherlands.
- [4] Falconí CE. (2012). Characterization of anthracnose in lupin and tamarillo in the Ecuadorian Andes. In: *Lupinus mutabilis* in Ecuador with especial emphases on anthracnose resistance, Chapter three of Cesar Falconi's PhD Thesis, Plant Breeding Laboratory, Wageningen University – The Netherlands.
- [5] Talhinhos,P; Sreennivasaprasad, S; Neves, J; Oliveira,H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. (En línea). Consultado 15 de octubre de 2010. Disponible en: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2002.92.9.986>
- [6] Nirenberg H.,Freiler U., and Hagedorn G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *The Mycological Society of America. Mycologia*. 94: 307-320.
- [7] Rodríguez, A. 2007. Caracterización Molecular en poblaciones de *Colletotrichum* spp. Asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. (En línea). Consultado el 2 de diciembre del 2010. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf>
- [8] Orozco, M. 2006. Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de *C. acutatum* Simmonds de cítricos en México. (En línea). México. Consultado 12 de Octubre del 2011. Disponible en: http://digeset.ucoj.mx/tesis_posgrado/Pdf/Mario_Orozco_Sanchez.pdf
- [9] INIAP, 2001. Evaluación agronómica y selección de 8 líneas promisorias de chocho en 5 localidades. (En línea). Ecuador. Consultado 7 de Octubre del 2011. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=PADIPR.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=005178>
- [10] Contreras, C. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense*), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendt), granadilla (*Passiflora ligulari* Juss), mango (*Mangifera indica*) y tallos de mora (*Rubus glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. (En línea). Consultado 10 de diciembre de 2010. Disponible en: www.corpoica.org.co/sitioweb/.../memoriaseminariofrutastropicales.pdf
- [11] INIAP, 2004. Determinación del comportamiento de los principales ecotipos comerciales de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) al ataque del agente causal de la mancha negra del tronco. (En línea). Ecuador. Consultado 7 de Octubre del 2011. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=PADIPR.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=005877>

[12] Martínez, E; et al. 2009. Identificación de las especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en lima Tahití, tomate de árbol y mango. (En línea). Colombia. Consultado 12 de Octubre del 2011. Disponible en: <http://www.agronomia.unal.edu.co/adjuntos/investigacion/revista/272/v27n2a09.pdf>

[13] Botero, M. 1999. Estudios biológicos y epidemiológicos de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en tomate de árbol y desarrollo de alternativas para su manejo integrado en Colombia. (En línea). Consultado 16 de octubre de 2010. Disponible en: http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061127162055_Interaccion%20microorganismo%20antracnosis%20tomate%20de%20arbol.pdf