

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

**Identificación de *Colletotrichum* spp. como agente causante de la antracnosis en  
hojas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en el centro de la región interandina del  
Ecuador**

**Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga**

**ANABELIZA KATHERIN CAJAS SALAZAR**

**Quito, 2020**

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que, la disertación de Microbiología de la candidata Anabeliza Katherin Cajas Salazar, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jeniffer Marcela Yáñez Altuna', written over a horizontal line.

**Mtr. Jeniffer Marcela Yáñez Altuna**  
Directora de la Disertación  
Quito, 16 de diciembre de 2020

## **DEDICATORIA**

Con cariño y amor, para todas las personas que con esmero y paciencia supieron  
encaminar mis pasos, para ver realizado este sueño.

Anabeliza

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Jaime Cajas y Ana Salazar por darme la oportunidad de formarme como profesional, por apoyarme en cada decisión y proyecto de vida. A mi hermana Diana y cuñado Javier por aportar cosas buenas a mi vida. A mi prima Gaby y a mi segunda mamá Paty por acompañarme en cada larga noche de estudio. A mis abuelitos por ser un ejemplo a seguir y permitirme ser su orgullo, y a toda mi familia por creer en mí.

A mi directora de disertación Jeniffer Yáñez, por contribuir en mi formación como investigadora dentro de su proyecto, por su orientación y por valorar mis ideas. Gracias al Dr. Martín Marcial y a la M<sup>crb</sup>. Anita Almeida, por enriquecer con sus conocimientos y sugerencias el desarrollo de esta tesis. Un especial agradecimiento, al Dr. Alberto Rengifo por siempre brindarme palabras de aliento para no decaer y a todos mis docentes por transmitirme su conocimiento e incentivar me a conocer el fascinante mundo de la Microbiología.

De la misma forma a mis mejores amigas Mishelle y Sol por su amistad incondicional y estar para mí. A mis amigos de universidad Andrea, Nicol, Estanislao y Lesly por echarme una mano cuando más lo necesité y por permitirme aprender más de la vida a su lado. Finalmente, a Gabriel por su inmensa paciencia y su inigualable deseo de verme triunfar.

Gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, que el día de hoy se ve reflejado en la culminación de mi carrera universitaria.

## TABLA DE COTENIDOS

<b>RESUMEN.</b> – .....	<b>1</b>
<b>PALABRAS CLAVE:</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT.</b> – .....	<b>2</b>
<b>KEYWORDS:</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>5</b>
<b>Muestreo</b> .....	<b>5</b>
<b>Aislamiento y purificación de hongos a partir de tejido sintomático</b> .....	<b>6</b>
<b>Identificación macroscópica y microscópica</b> .....	<b>7</b>
<b>Identificación molecular</b> .....	<b>7</b>
<b>Postulados de Koch</b> .....	<b>8</b>
<b>Análisis de datos</b> .....	<b>9</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>9</b>
<b>Aislamiento y caracterización morfológica</b> .....	<b>9</b>
<b>Identificación molecular</b> .....	<b>10</b>
<b>Postulados de Koch</b> .....	<b>10</b>
<b>Análisis de datos</b> .....	<b>11</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>16</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>17</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>17</b>

<b>FIGURAS .....</b>	<b>28</b>
<b>TABLAS .....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A) Vista panorámica de una parcela de uvilla. B-C-D) Hojas de uvillas en estados avanzados de la enfermedad (manchas necróticas, halos cloróticos y anillos concéntricos)..... 28
- Figura 2.** Observación macroscópica y microscópica de aislados presuntivos de *Colletotrichum* spp. (A.T 400X). Colonias en PDA anverso y reverso (A1-D2-G3-J4-M5-P6); Colonias en MEA anverso y reverso (B1-E2-H3-K4-N5-Q6). Conidias: C1) P4h003; F2) P4h010 ; I3) P4h011; L4) P4h014; Q5) P4h016; R6) P5h006-2..... 29
- Figura 3.** Estructuras microscópicas de *Colletotrichum* spp. (A.T. 400X). A) conidias, B) apresorio, C) bases de setas, D) conidióforo, E) acérvulo. .... 30
- Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR a partir del ADN obtenido de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociado a la antracnosis en hojas de uvilla. M = marcador molecular 100pb; carril 1 a 6 aislados de hongos obtenidas de hojas; (+) = control positivo (*Phoma* sp.); (-) = control negativo (agua libre de nucleasas). 1) P4h003; 2) P4h010, 3) P4h011; 4) P4h014; 5) P4h016; 6) P5h006-2..... 31
- Figura 5.** A) Vista panorámica de plántulas de uvilla infectadas con diferentes especies de *Colletotrichum* spp. en condiciones de invernadero (postulados de Koch). Hojas sintomáticas en etapa inicial de antracnosis (13 días después de la inoculación). 1) P4h003; 2) P4h014, 3) P4h016; 4) P5h006-2; 5) Control negativo ..... 32
- Figura 6.** Conidias recuperadas en los postulados de Koch idénticas a los aislados originales (A.T 400X) 1) P4h003; 2) P4h014, 3) P4h016; 4) P5h006-2..... 33

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Aislados fúngicos colectados en Cotopaxi y Pichincha obtenidos a partir de plantas diferentes de <i>Physalis peruviana</i> L. ....	34
<b>Tabla 2.</b> Tamaño de estructuras microscópicas de cada aislado después de 15 días de crecimiento. ....	35
<b>Tabla 3.</b> Identificación molecular de secuencias ITS de aislados fúngicos obtenidos de tejido foliar necrótico.....	36
<b>Tabla 4.</b> Sintomatología en hojas de uvilla post-infección, postulados de Koch. ....	37
<b>Tabla 5.</b> Identificación molecular de secuencias ITS de los aislados fúngicos obtenidos en los postulados de Koch. ....	38

## MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN

### Revista

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas

### Título

Identificación de *Colletotrichum* spp. como agente causante de la antracnosis en hojas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en el centro de la región interandina del Ecuador

### Autores

Anabeliza Katherin Cajas Salazar\*

### Correo electrónico

\* [anabelizacajas@gmail.com](mailto:anabelizacajas@gmail.com)

### Dirección

Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Carrera de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

El siguiente trabajo de investigación se presenta en el formato de la Revista *Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* a partir de la siguiente página.

**Identificación de *Colletotrichum* spp. como agente causante de la antracnosis en  
hojas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en el centro de la región interandina del  
Ecuador**

**Identification of *Colletotrichum* spp. as causal agent of anthracnose in goldenberry  
leaves (*Physalis peruviana* L.) in the center of the Sierra region of Ecuador**

Anabeliza Cajas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador.

**RESUMEN. –**

La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una especie frutícola andina que por su alto valor nutricional y medicinal ha adquirido importancia económica en todo el mundo. Lamentablemente, la productividad y calidad del cultivo es afectado por agentes bióticos como: hongos, bacterias, nematodos y virus. La antracnosis es una enfermedad fúngica que lesiona las hojas de la uvilla y es objetivo de este estudio, identificar a *Colletotrichum* spp. como el agente causal de este problema en las provincias de Cotopaxi y Pichincha. Para esto, se colectó tejido foliar con manchas necróticas con anillos concéntricos y los aislados fúngicos obtenidos se caracterizaron fenotípicamente mediante descripción macroscópica y microscópica de la colonia. La identificación molecular se realizó mediante análisis de secuencias obtenidas con los *primers* ITS1/ITS4 que se compararon en bases de datos referenciales (GenBank, MycoBank, ISHAM, UNITE) y presentaron una similitud  $\geq 97$  % para *C. gloeosporioides*, *C. fructicola*, *C. scovillei* y *C. coccodes*. Finalmente, se confirmó mediante postulados de Koch que estas cepas causan síntomas de antracnosis en plantas de uvilla sanas, mediante el re-aislamiento y análisis

morfológico y molecular de los hongos fitopatógenos que fueron idénticos a los originales. Es importante destacar que este es el primer reporte de un complejo de especies de *Collectotrichum* infectando cultivos de uvillas en Ecuador.

**PALABRAS CLAVE:**

Antracnosis, *Colletotrichum* spp., espaciador transcrito interno, postulados de Koch, *Physalis peruviana* L.

**ABSTRACT. –**

The goldenberry (*Physalis peruviana* L.) is an Andean fruit species that due to its high nutritional and medicinal value has acquired economic importance throughout the world. Unfortunately, the productivity and the quality of the crop is affected by biotic agents such as: fungi, bacteria, nematodes and virus. Anthracnose is a fungal disease that damages the leaves of the goldenberry. The objective of this study is to identify *Colletotrichum* spp. as the causal agent of this disease in Cotopaxi and Pichincha provinces. Leaf tissue with necrotic spots with concentric rings was collected and the fungal isolates obtained were phenotypically characterized by macroscopic and microscopic description of the colony. The molecular identification was done by analysis of sequences obtained with the ITS1 / ITS4 primers compared in reference databases (GenBank, MycoBank, ISHAM and UNITE) with a  $\geq 97$  % similarity for *C. gloeosporioides*, *C. fructicola*, *C. scovillei* and *C. coccodes*. Finally, Koch postulates confirmed that these strains cause anthracnose in healthy goldenberry plants, through re-isolation, morphological and molecular analysis of the phytopathogenic fungi that were identical to the original. It is important to highlight that this is the first report of a *Collectotrichum* species complex infecting goldenberries crops in Ecuador.

## **KEYWORDS:**

Anthracnose, *Colletotrichum* spp., Internal transcribed spacer, Koch postulates, *Physalis peruviana* L.

## **INTRODUCCIÓN**

La uvilla (*Physalis peruviana* L.) conocida como uchuva, goldenberry, aguaymanto o ushun es originaria de la región andina de Sudamérica y pertenece a la familia Solanaceae (Dostert et al. 2012). Es una planta perenne, arbustiva y ramificada con un crecimiento que llega a superar los dos metros de altura; su potencial óptimo de cultivo se da en altitudes entre 1800 y 2800 msnm con temperaturas promedio entre 13 y 18 °C (Almanza y Fischer 2012; Dostert et al. 2012; Aldas 2013). *Physalis* se caracteriza por poseer un tallo herbáceo cubierto de vellosidades suaves; hojas acorazonadas; flores acampanadas y bayas carnosas, semiácidas globulosas (1,25 a 2,5 cm y 4 a 10 g) que contienen entre 150 a 300 semillas (Almanza y Fischer 2012; Aldas 2013; García et al. 2014; Servicio Nacional de Aprendizaje SENA 2014; Ruiz Gaitan et al. 2018). El valor nutricional del fruto es alto por poseer vitaminas (A, B y C), fibra y minerales como fósforo y hierro (Almanza y Fischer 2012; Servicio Nacional de Aprendizaje SENA 2014). Esta especie frutícola andina ha adquirido gran importancia económica por su potencial alimenticio y medicinal en los Andes sudamericanos, principalmente en Colombia, Perú y Ecuador (Trillos González et al. 2008; Tapia et al. 2020).

Las plantaciones de uvilla en el Ecuador se encuentran en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar y Chimborazo, ocupando un aproximado de 700 hectáreas. El Ecuador exportó en el año 2019, 206 mil dólares a

destinos como: Países Bajos, Estados Unidos, Alemania, Francia y Canadá ( Pro Ecuador 2020; Servicio de Aduana del Ecuador SENA 2021). La uvilla es una alternativa real de exportación para el pequeño productor, que según datos proporcionados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), de las 992 Unidades Productivas Agrícolas (UPAs) el 98 % corresponde a pequeños productores (Agrocalidad 2019; Pro Ecuador 2020). Debido a la importancia comercial de este cultivo en el mercado nacional e internacional, resulta prioritario que los productores inviertan recursos financieros en controles fitosanitarios eficaces, de manera que, se obtenga una producción de uvilla de buena calidad y con un alto rendimiento que garantice la venta del producto final (Fischer et al. 2014; Pro Ecuador 2020).

Considerando la creciente demanda global de uvilla, es importante optimizar el control de plagas y enfermedades que afectan a este cultivo, debido a que limitan su producción y comercialización a nivel mundial (Pinzón 2014). Lamentablemente, este cultivo a menudo se ve afectado por diversos agentes bióticos como: hongos, bacterias, nematodos y virus ( Fischer et al. 2005; García et al. 2014; Servicio Nacional de Aprendizaje SENA 2014). La antracnosis es una patología causada por el hongo *Colletotrichum*, los síntomas de esta enfermedad incluyen lesiones necróticas limitadas, a menudo deprimidas, en hojas, tallos, flores y frutos, así como pudrición de la corona y del tallo, y tizón de las plántulas (Waller et al. 2002; Cannon et al. 2012; Tapia et al. 2020). *Colletotrichum* spp. se caracteriza por ser altamente destructivo, ataca con gran severidad un amplio rango de hospederos (cereales, pastos, legumbres, vegetales, ornamentales y cultivos perennes), se presenta en temporada de lluvias y en condiciones de alta humedad relativa (Nieto et al. 2019; Tapia et al. 2020). La infección de este patógeno se desarrolla en tres etapas: adhesión de esporas, germinación y formación del apresorio, y penetración de la hifa

(intracelular y/o subcuticular); en la colonización intracelular, se desarrolla una infección inicial en base a una fase biotrófica, asociada con una gran hifa primaria intracelular, convirtiéndose después en una fase necrotrófica destructiva asociada con una hifa secundaria angosta, que se ramifica a través del tejido del hospedante mientras que en la colonización cuticular, el patógeno no penetra inmediatamente el lumen celular, sino que se desarrolla bajo la cutícula y después de un breve período asintomático, el hongo comienza a expandirse rápidamente a través del tejido del hospedante, finalmente estas dos formas matan las células vegetales y degradan las paredes celulares mediante las enzimas producidas por el hongo (Diéguez-Uribeondo et al. 2005; O'Connell et al. 2012). La antracnosis reduce sustancialmente la productividad del cultivo y provoca necrosis de los tejidos, a tal punto que el rendimiento baja e inclusive puede existir la pérdida total del cultivo, y a futuro puede convertirse en un gran problema fitosanitario (García et al. 2014; Pinzón 2014). La identidad precisa de un patógeno, la descripción de sus rasgos característicos, la diversidad y distribución geográfica de sus poblaciones, son datos fundamentales para reducir los efectos devastadores de la enfermedad y evaluar eficientemente las medidas de prevención y control de enfermedades (Pinzón 2014; Nieto et al. 2019). En Ecuador existe limitada información sobre los patógenos que afectan al cultivo de uvilla, incluyendo *Colletotrichum* spp. (Agrocalidad 2017). Por lo anterior, esta investigación pretende identificar el agente causal de la antracnosis en hojas de uvilla, lo que facilitará su control en la región interandina del Ecuador.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestreo**

La colecta de muestras se realizó en cinco parcelas productoras de uvilla de las provincias de Pichincha (San José de las Minas) y Cotopaxi (Pilaló), pertenecientes a las zonas 2 y

3 de la región interandina del Ecuador (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo 2019). El muestreo se desarrolló de manera aleatoria estratificada, en cada parcela se seleccionaron 25 plantas con sintomatología caracterizada por necrosis y manchas a nivel foliar (Pinzón 2014). El material vegetal seleccionado se recolectó en fundas de cierre hermético con su respectiva etiqueta (fecha y hora de recolección, nombres del recolector, zona y georreferencia) y se transportó bajo condiciones de refrigeración, al laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), para el respectivo análisis en un lapso no mayor a 24 horas (Agrios 2005).

#### **Aislamiento y purificación de hongos a partir de tejido sintomático**

Las muestras foliares recolectadas se lavaron con abundante agua corriente para limpiar la contaminación superficial interferente. A partir de las lesiones se realizaron cortes de 20 mm<sup>2</sup>, los cuales fueron desinfectados mediante un lavado en hipoclorito de sodio al 1 % durante un minuto, después en agua destilada estéril durante 30 segundos, luego en etanol al 70 % por 30 segundos, y finalmente dos enjuagues con agua destilada estéril por un minuto (Agrios 2005). Los fragmentos de tejido se secaron sobre papel toalla estéril durante 5 a 10 minutos y se sembró cada pedazo en cajas Petri conteniendo el medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar, por sus siglas en inglés), suplementado con gentamicina (Gentamax 280mg/2ml en 1L), para inhibir la contaminación bacteriana (Agrios 2005; Morales et al. 2018). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente (20-25°C) y se revisó el crecimiento micelial a diario durante 15 días. Los hongos de interés se subcultivaron en PDA y MEA (Malt Extract Agar, por sus siglas en inglés) bajo las mismas condiciones iniciales hasta conseguir cultivos axénicos, este último medio de cultivo se usó para observar esporulación (Alemu et al. 2020).

## **Identificación macroscópica y microscópica**

El desarrollo de los aislamientos fúngicos puros fue observado diariamente por 15 días. La caracterización macroscópica se realizó en función a características morfológicas de la colonia, y se registró las siguientes variables: color (reverso-anverso), textura, bordes, esporulación y presencia de exudados (Velázquez et al. 2018). La caracterización microscópica se realizó a partir de una impronta del micelio del hongo, usando cinta adhesiva transparente, que fue teñida con azul de lactofenol y observada al microscopio óptico con una amplificación de 400X (Barnett y Hunter 1998; Molina et al. 2017; Crous et al. 2019). La longitud y ancho de las conidias (15 por aislamiento) se midieron con el software Piximetre (Zapata y Opazo 2017). Para corroborar las características macro/microscópicas visualizadas, se utilizó claves dicotómicas y literatura especializada para la identificación del género *Colletotrichum* spp. (Barnett y Hunter 1998; Hanlin 1998; Crous et al. 2019).

## **Identificación molecular**

Se extrajo ADN fúngico utilizando el kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega 2019) y su concentración y pureza se determinó con un espectrofotómetro *NanoDrop 200* con una absorbancia de 260/280 y 260/230 (Thermo Fisher Scientific 2010). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usó para la amplificación de la región ITS (Internal transcribed spacers, por sus siglas en inglés), del ADN ribosomal de los aislados y controles (positivo - negativo) con los *primers* ITS-1 e ITS-4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). Cada reacción se llevó a cabo con un volumen total de 25µl con el siguiente programa térmico: desnaturalización inicial

a 94 °C por 5 min; 40 ciclos compuesto de desnaturalización a 93 °C por 1 minuto, alineamiento a 55 °C por 2 minutos; extensión a 72 °C por 2 minutos; y una extensión final de 72 °C por 10 minutos (Bruns et al. 1999; Espinosa 2007; Salazar et al. 2012). La productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % a 95 voltios por 60 minutos (Espinosa 2007) y se visualizaron bajo luz UV con un tamaño esperado ~450 a ~550 pares de bases (pb) (Salazar et al. 2012; Gijón et al. 2019). Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) para ser purificados y secuenciados por el método de Sanger. Las secuencias concenso se obtuvieron con la herramienta *Clustal W* del programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013), y para validar su identidad molecular fueron comparadas con aquellas depositadas en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) así como también, en bases curadas en MycoBank, ISHAM y UNITE (Yegneswaran et al. 2017; Velázquez et al. 2018; Macrogen 2020).

### **Postulados de Koch**

Se obtuvieron plántulas de uvilla mediante la extracción húmeda de semillas, estas fueron desinfectadas con alcohol al 70 % para ser germinadas y sembradas en un sustrato con 75 % de humus más 25 % de cascarilla de arroz; dependiendo de las condiciones climáticas se dotó de un riego diario tanto en semillero como en macetas (Socay 2017). Una vez que las plántulas de uvilla desarrollaron tres a cuatro hojas verdaderas, se preparó el inóculo de conidias siguiendo el protocolo de Castellanos y colaboradores (2011). Se propagó el hongo en cajas Petri con agar PDA incubadas por 15 días a 25 °C, se agregó 5 ml de agua destilada estéril en cada caja Petri para desprender las conidias mediante un raspado superficial con bisturí estéril y lo obtenido se filtró con gasas estériles. La suspensión se

diluyó con Tween 80 al 0.01 % hasta alcanzar una concentración de  $1.2 \times 10^6$  conidias/ml, contabilizadas con cámara de Neubauer (Castellanos et al. 2011).

La superficie de las hojas de 14 plántulas de uvilla fueron inoculadas mediante tres métodos: aspersión, laceración de los tejidos e inyección de la suspensión (López y Castaño 2013), cada método se aplicó en dos hojas por planta y por cepa. Las plantas inoculadas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero con temperaturas de  $20 \pm 2$  °C y 60 % humedad relativa. Los síntomas característicos de *Colletotrichum* en las plántulas inoculadas se evaluaron después de 10 días. El patógeno fue aislado nuevamente mediante la metodología antes descrita (Castellanos et al. 2011), y su identidad se confirmó mediante análisis microscópico y molecular.

### **Análisis de datos**

Los datos registrados se presentaron y organizaron mediante estadística descriptiva para establecer la frecuencia de *Colletotrichum* spp. en las provincias en estudio.

## **RESULTADOS**

### **Aislamiento y caracterización morfológica**

A partir de 125 muestras de tejido foliar sintomático (Figura 1), se obtuvieron seis aislamientos fúngicos de dos de las cinco parcelas muestreadas, que coincidieron con las características macroscópicas de *Colletotrichum* spp. (Tabla 1). Después de 15 días de crecimiento en medio PDA las colonias fúngicas presentaron patrones de crecimiento circular, micelio algodonoso escaso-abundante, borde ondulado, anillos concéntricos grises-marrones-salmón y en algunos casos masas irregulares negras alrededor de la colonia. Las colonias mostraron morfología divergente en cuanto a color donde, P4h010,

P4h011 y P4h016 desarrollaron colonias blancas-gris-verde (anverso) y crema (reverso); P4h014 y P5h006-2 colonias blancas-salmón-café (anverso) y salmón-café (reverso); mientras que, P4h003 una colonia blanco-salmón (anverso y reverso) (Figura 2). Las características morfológicas en el medio MEA fueron similares a los observados en PDA excepto por el aislado P4h011 que desarrolló una colonia color café y P4h014 que presentó exudados sobre la colonia (Figura 2). Los conidios se presentaron unicelulares, hialinos, cilíndricos con extremos redondeados y agudos; apresorios irregulares color marrón; bases de setas marrones y conidióforos hialinos dispuestos en empalizada sobre el estroma de los acérvulos en las preparaciones microscópicas, estas características microscópicas fueron similares en los dos medios de cultivo (Figura 3). Las medidas de las conidias se presentan en la tabla 2.

### **Identificación molecular**

La amplificación del ADN genómico de los seis aislamientos con los *primers* ITS1 e ITS4, reportó fragmentos de ~500 pb y las secuencias consenso resultantes correspondieron a distintas especies de *Colletotrichum* spp. (Figura 4). Las secuencias presentaron una similitud  $\geq 97$  % y cobertura del 100 % con aquellas depositadas en los bancos de genes (GenBank, MycoBank, ISHAM y UNITE). Las especies identificadas fueron *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. fruticola*, *C. scovillei* y *C. coccodes* (Tabla 3).

### **Postulados de Koch**

El día 13 después de la inoculación se visualizó que cuatro de seis cepas produjeron síntomas típicos de antracnosis en las hojas de las plántulas tratadas (Tabla 4). Estos se presentaron como lesiones con tamaño de 0,3 a 0,8 mm de diámetro, de forma redonda

irregular, color castaño claro, seguidas de una necrosis parcial y formación leve de anillos concéntricos, mientras que, el control negativo no presentó cambios en el tejido vegetal (Figura 5). El método de inoculación por aspersión infectó cuatro hojas de aislados diferentes, por laceración dos hojas y por inyección dos hojas. Los hongos re-aislados a partir de hojas infectadas presentaron características morfológicas y moleculares idénticas a las cepas inoculadas (Figura 6) (Tabla 5).

### **Análisis de datos**

Se identificaron tres cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* (50 %) siendo la especie más frecuente y cepas individuales de *C. fructicola* (17 %), *C. coccodes* (17 %) y *C. scovillei* (16 %).

### **DISCUSIÓN**

En esta investigación, se reporta por primera vez a cuatro especies diferentes de *Colletotrichum* spp. como causantes de antracnosis en uvilla, basados en la caracterización morfológica y secuencia del ITS. Realizar un primer reporte de estos hongos contribuye al conocimiento de la causa de la antracnosis en cultivos de uvilla en Ecuador, el desarrollo y la perfección de las técnicas de diagnóstico, siendo un mecanismo clave en la elección de prácticas de manejo integral de la enfermedad (Gañán et al. 2015). La perspectiva de exportación de la uvilla (*Physalis peruviana* L.) en Ecuador se ha incrementado de forma significativa en los últimos años, motivando a los productores a extender sus cultivos y sobre todo a obtener un producto de buena calidad. Sin embargo, la vulnerabilidad del cultivo a enfermedades que lo afectan durante la etapa de producción es limitante para que esto se cumpla. Por esta razón, es primordial la identificación y el manejo de las principales enfermedades en el cultivo de uvilla, en

especial las causadas por hongos y bacterias, que son los que mayores daños ocasionan (Zapata et al. 2002). De esta manera, los agricultores pueden detectar a tiempo problemas fitosanitarios y prevenirlos, evitando así pérdidas en el rendimiento del cultivo (Zapata et al. 2002; Nieto et al. 2019).

Varios estudios señalan que la antracnosis cuyo agente etiológico es *Colletotrichum* spp. ataca a cultivos en regiones tropicales, subtropicales y templadas en todo el mundo (Wharton y Diéguez Uribeondo 2004; Gan et al. 2019; Khodadadi et al. 2020; Nieto et al. 2019; Sharma et al. 2017), sin embargo, hasta el momento de redacción de este trabajo no se reportó su presencia en plantas de *Physalis peruviana* L. Según Dean y colaboradores (2012), el género *Colletotrichum* por su relevancia científica-económica está clasificado en el octavo grupo más importante de hongos patógenos de plantas en el mundo. Además, este organismo es interesante por su estilo de vida intracelular hemibiotrófico único y la facilidad con la que se puede cultivar y manipular en laboratorio (Dean et al. 2012). Este hongo provoca lesiones necróticas inmersas de color gris con borde oscuro que incrementan de tamaño a medida que la lesión avanza, y si desarrollan acérvulos generalmente se ven como anillos concéntricos ya sea en hojas, tallos, flores o frutos (Rojo-Báez et al. 2017; Weir et al. 2012). Todos los síntomas descritos antes coinciden con los observados en las muestras recolectadas. *Colletotrichum* spp. es un género que posee una alta complejidad taxonómica y diversidad genética, sin embargo, a partir del año 2012 se usa el término *Colletotrichum* (anamorfo) sobre el de *Glomerella* (teleomorfo) debido a que ese nombre es el más utilizado en las ciencias aplicadas (Zhang et al. 2013). De acuerdo a su clasificación taxonómica encuadra en la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Glomerellales, familia Glomerellaceae (Réblová et al. 2011; National Center for Biotechnology Information 2020).

Las características morfo-culturales que se destacan son: las diferentes tonalidades de las colonias (blanco, gris, verde, salmón, café y crema), la presencia de anillos concéntricos grises-marrones, de masas conidiales negras y de exudados. Abera y colaboradores (2016), determinaron que este hongo muestra un mejor crecimiento y esporulación en PDA y MEA que en TWA (Tap Water Agar, por sus siglas en inglés) y SDA (Sabouraud Dextrose Agar, por sus siglas en inglés), que en general mostraron micelio algodonoso en algunos casos abundante o escaso, crecimiento circular con borde ondulado y anillos concéntricos. Además, Carreño y Sánchez (2020) indican que algunas cepas de *Colletotrichum* spp. presentan masas conidiales negras de textura dura en el medio de cultivo cuando intentan formar acérvulos. Nirenberg y colaboradores (2002), explican que la variabilidad de color de las colonias podría depender de la preferencia del hospedero por parte de la especie o por aislamiento geográfico. Tradicionalmente, la identificación de *Colletotrichum* spp. se basa en sus caracteres morfológicos como: el tamaño y la forma de los conidios y apresorios; presencia o ausencia de setas, esclerocios, acérvulos, y caracteres culturales del teleomorfo como: el color de la colonia, la tasa de crecimiento y la textura (Hyde et al. 2009). El hongo en estudio desarrolló conidias, hifas, apresorios, bases de setas, conidióforos y acérvulos, estructuras que participan directa e indirectamente en el proceso de infección de una planta. Estas estructuras reproductivas mostraron similitud tanto en MEA como PDA, pero en diferentes tiempos. Las características morfológicas mencionadas son típicas de *Colletotrichum* spp. Por lo tanto, estas permitieron orientar la investigación hacia identificación de los aislados obtenidos como parte de este género fúngico. A pesar de ello, una identificación rigurosa a nivel de especie requiere de una caracterización basada no solo en una caracterización fenotípica, sino también genotípica, ya que las especies tienen pocos caracteres morfológicos

distintivos que pueden coincidir entre ellos, varían por factores ambientales (temperatura o sustrato de crecimiento) y porque las etapas teleomórficas rara vez se forman (Hyde et al. 2009; Cannon et al. 2012). Además, esto ha llevado a organizar al género en complejos como: *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. magnum* y *C. boninense*, los cuales facilitan la identificación de las especies involucradas (Cannon et al. 2012; Cobo 2017).

Actualmente, el uso combinado de herramientas de taxonomía polifásica (diagnóstico molecular junto con técnicas morfológicas tradicionales) constituye una estrategia confiable para estudiar las especies de *Colletotrichum* spp. (Hyde et al. 2009; Cannon et al. 2012; Rojo-Báez et al. 2017; Tapia et al. 2020). En ese contexto, el análisis molecular permitió amplificar la región del gen ITS que arrojó productos de PCR con un tamaño de banda aproximado de 500 pb para los seis aislamientos (Cobo 2017; Gijón et al. 2019). La región espaciadora transcrita interna (ITS) es el código de barras más comúnmente usado para el reconocimiento molecular y análisis filogenético primario de hongos por su alta amplificación de ADN y secuenciación (Cobo 2017; Yegneswaran et al. 2017). Las identificaciones de estos aislamientos correspondieron a especies del género *Colletotrichum* spp., donde la especie que se aisló con mayor frecuencia fue *C. gloeosporioides* (complejo gloeosporioides), seguido de *C. fructicola* (complejo gloeosporioides), *C. scovillei* (complejo acutatum) y *C. coccodes* (Shin et al. 2019; de Silva et al. 2019). Es importante mencionar que, la identidad de las secuencias de interés fue comprobada en varias bases de datos curadas, ya que en ocasiones GenBank alberga secuencias incorrectamente identificadas o incompletas (Yegneswaran et al. 2017). Por otro lado, algunos investigadores sugieren complementar la caracterización con un análisis multilocus, donde el ADN de interés es analizando usando marcadores múltiples con el fin de encontrar polimorfismos en las secuencias para finalmente llegar a un

diagnóstico preciso y clasificación filogenética del patógeno; entre los sets de *primers* usados están: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), actina (ACT), quitina sintetasa (CHS1),  $\beta$ -tubulina 2 (tub2), histamina (HIS3), glutamina sintetasa (GS), calmodulina (CAL), liasa (APN2), región intergénica de *apn2* y MATI-2-1 (ApMat), factor de elongación 1-alfa (EF-1 $\alpha$ ) y manganeso superóxido dismutasa (SOD2) (Rojó-Báez et al. 2017).

Las cepas P4h003 (*C. fructicola*), P4h014 (*C. gloeosporioides*), P4h016 (*C. gloeosporioides*) y P5h006-2 (*C. coccodes*) causaron síntomas de antracnosis en las plantas de uvas inoculadas. Presentando pequeñas manchas circulares con necrosis parcial, similar a lo reportado por otros autores (Waller et al. 2002; Cannon et al. 2012; Tapia et al. 2020). Los diferentes métodos de inoculación aplicados en este estudio condujeron a resultados uniformes, en términos de sintomatología. El método de inoculación por aspersión fue más efectivo en relación al método por laceración y por inyección (Tabla 4), sin embargo, de Silva y colaboradores (2019) indican que realizar una herida en el tejido del huésped mejora enormemente la infectividad de *Colletotrichum* spp. La cepa P4H010 (*C. scovillei*) y P4H011 (*C. gloeosporioides*) no causaron síntomas, hay que resaltar que una cepa de las tres de *C. gloeosporioides* no tuvo la capacidad de generar enfermedad. La ausencia de patogenicidad puede relacionarse a una falla en el proceso de inoculación, o que las condiciones ambientales o fisiológicas del hospedero impidieron el desarrollo del hongo manteniéndolo en un estado de quiescencia, condición donde el patógeno reduce su actividad metabólica deteniendo el proceso de infección por un periodo considerable (Parra 2008). Además, Baquero y Pérez (2002) mencionan que, para que la enfermedad se desarrolle, las esporas del patógeno necesitan una película de humedad en la superficie de la planta para su germinación y penetración, factor que pudo

ocasionar la no infectividad. Finalmente, la confirmación de patogenicidad de cuatro de seis cepas se verificó mediante el re-aislamiento del hongo fitopatógeno y la identificación morfológica y molecular, las cuales coincidieron con las previamente obtenidas a partir de los síntomas en campo, verificando así el cumplimiento de los postulados de Koch.

Los resultados del presente estudio sobre la variabilidad morfológica y genética de las diferentes especies encontradas de *Colletotrichum* spp., y su patogenicidad son relevantes y de gran utilidad para generar alternativas de solución que contribuyan a reducir el daño producido por este patógeno en cultivos de uvilla y a la vez aumentar la productividad de esta especie frutícola.

## **CONCLUSIONES**

El presente estudio constituye el primer reporte que asocia a varias especies del género *Colletotrichum* como agentes causales de la antracnosis en cultivos de uvilla en Ecuador. De acuerdo al análisis morfológico y molecular, se identificaron las especies *C. gloeosporioides*, *C. fructicola*, *C. scovillei* y *C. coccodes*, las mismas que se agruparon en los complejos de especies acutatum y gloeosporioides. Incluso, se evidenció la diversidad morfológica y cultural que pueden presentar las especies de *Colletotrichum* spp., en esta planta de la familia Solanaceae, en cuanto a variabilidad del color de las colonias y forma de las conidias. La mayoría de las cepas cumplieron con los postulados de Koch pudiendo comprobarse que las especies *C. gloeosporioides*, *C. fructicola* y *C. coccodes* causan antracnosis, sin desmerecer a los aislados que no presentaron infectividad, ya sea por razones de inadaptabilidad o que se mantuvieron en estado de quiescencia. Finalmente, este estudio servirá como una guía para detección rápida y

precisa de este fitopatógeno reduciendo el daño que puede ocasionar sobre los cultivos de uvilla, lo cual genera pérdidas económicas y a la vez favorecer el aumento de producción de esta especie frutícola. Se sugiere para próximos estudios reforzar la identificación de este microorganismo con otros marcadores, así como también, formular medidas preventivas y de control para esta enfermedad en cultivos de uvilla.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue financiado por el proyecto “Diagnóstico de las enfermedades y de plagas en cultivos comerciales de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en el Ecuador” auspiciado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y a cargo de la Mtr. Jeniffer Yánez. Un agradecimiento especial a la empresa Terrafertil y a los cultivadores de uvilla por autorizar muestrear sus fincas, y a la Unidad Educativa “Belisario Quevedo” por permitir el uso de sus equipos para la finalización de esta investigación en tiempo de pandemia.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abera A, Lemessa F, Adunga G. 2016. Morphological Characteristics of Colletotrichum Species Associated with Mango (*Mangifera indica* L.) in Southwest Ethiopia. Food Sci Qual Manag . 48. [accessed 2020 Oct 19]. [www.iiste.org](http://www.iiste.org).
- Agrios G. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Estados Unidos: Elsevier Academic Press.
- Agrocalidad. 2017. Resolución 0122 Establecimiento de plagas reglamentadas a la lista de plagas cuarentenarias no presentes en el Ecuador: Lista de plagas cuarentenarias no presentes en Ecuador. [accessed 2020 Oct 19]. <https://www.ippc.int/es/countries/ecuador/reportingobligation/2012/12/lista-de->

plagas-cuarentenarias-no-presentes-en-ecuador-/

Agrocalidad. 2019. Primer envío de uvilla ecuatoriana con destino a Estados Unidos.

[accessed 2020 Oct 14]. <http://web.agrocalidad.gob.ec/primer-envio-de-uvilla/>.

Aldas SE. 2013. Uso de la uvilla (*Physalis peruviana*) en la repostería como alternativa gastronómica nutricional [Tesis de pregrado]. [Ibarra (Ecuador)]: Universidad

Técnica del Norte. [accessed 2020 Oct 8].

[http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/3534/2/06 GAS 025 ARTICULO CIENTIFICO.pdf](http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/3534/2/06_GAS_025_ARTICULO_CIENTIFICO.pdf).

Alemu K, Adugna G, Lemessa F, Muleta D. 2020. Variation among colletotrichum isolates associated with coffee berry disease in Ethiopia. *Cogent Biol.*

6(1):1740537. doi:10.1080/23312025.2020.1740537. [accessed 2020 Oct 19].

<https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23312025.2020.1740537>.

Almanza P, Fischer G. 2012. Fisiología del cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.).

In: Reunião Técnica da cultura da *Physalis*. Brasil. p. 1–20. [accessed 2020 Oct 9].

[https://www.researchgate.net/publication/256570745\\_Fisiologia\\_del\\_cultivo\\_de\\_la\\_uchuva\\_Physalis\\_peruviana\\_L\\_Brasil](https://www.researchgate.net/publication/256570745_Fisiologia_del_cultivo_de_la_uchuva_Physalis_peruviana_L_Brasil).

Baquero MJ, Perez LM. 2002. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. como agente causal de la antracnosis en *Discorea* spp. Universidad de Sucre .

Barnett HL, Hunter B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. USA: The American Phytopathological Society. [accessed 2020 Oct 19].

[https://www.academia.edu/35499449/Illustrated\\_genera\\_of\\_imperfect\\_fungi\\_fo](https://www.academia.edu/35499449/Illustrated_genera_of_imperfect_fungi_fo)  
[urth\\_edition\\_Barnett\\_y\\_Hunter\\_pdf\\_pdf](urth_edition_Barnett_y_Hunter_pdf_pdf).

Bruns T, Lee S, White TJ, Sninsky J. 1999. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics.

<https://www.researchgate.net/publication/262687766>.

Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Stud Mycol.* 73:181–213. doi:10.3114/sim0014.

Carreño JA, Sánchez LF. 2020. Caracterización morfocultural, patogenicidad y sensibilidad in-vitro de hongos asociados a Antracnosis [Tesis de pregrado]. [Manabí (Ecuador)]: Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. [accessed 2020 Oct 14]. <http://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/1318>.

Castellanos G, Jara CE, Mosquera GM. 2011. Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Centis S, Guillas I, Séjalon N, Esquerré-Tugayé MT, Dumas B. 1997. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: Cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Mol Plant-Microbe Interact.* 10(6):769–775. doi:10.1094/MPMI.1997.10.6.769. [accessed 2020 Nov 13]. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.1997.10.6.769>.

Cobo GM. 2017. Identificación y caracterización de especies de *Colletotrichum* spp., causantes de antracnosis en frutos de aguacate *Persea americana* var. Hass [Tesis de postgrado]. [Palmira (Colombia)]: Universidad Nacional de Colombia.

Crous PW, Verkley GJ, Groenewald JZ, Samson RA. 2019. *Fungal Biodiversity*. CBS Laboratory Manual Series. Vol.I. 269 pp.

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, et al. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 13(4):414–430.

doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x. [accessed 2020 Oct 18].  
<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.

Diéguez-Uribeondo J, Förster H, Soto-Estrada A, Adaskaveg JE. 2005. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. *Phytopathology*. 95(7):751–758. doi:10.1094/PHYTO-95-0751.

Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre MI, Weigend M. 2012. Hoja botánica: Aguaymanto. Primera. Lima - Perú: Giacomotti Comunicación Gráfica S.A.C. [accessed 2020 Oct 7].  
<https://repositoriodigital.minam.gob.pe/bitstream/handle/123456789/188/BIV01200.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Espinosa L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR. In: *Las herramientas moleculares*. p. 517–536. [accessed 2020 Oct 20]. [http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes\\_](http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes_).

Fischer G, Almanza-Merchán PJ, Miranda D. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Rev Bras Frutic*. 36(1):40. doi:10.1590/0100-2945-441/13. [accessed 2020 Oct 13]. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>.

Fischer G, Miranda D, Piedrahita W, Romero J. 2005. *Avances En Cultivo, Poscosecha y Exportación de La Uchuva (Physalis Peruviana L.) En Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. [accessed 2021 Ene 11].

Fuentes C. 2007. Los postulados de Koch: Revisión histórica y perspectiva actual. *Rev Complutense de Ciencias Veterinarias*. 1(2):262–266.

Gan P, Tsushima A, Narusaka M, Narusaka Y, Takano Y, Kubo Y, Shirasu K. 2019. Genome sequence resources for four phytopathogenic fungi from the

colletotrichum orbiculare species complex. Mol Plant-Microbe Interact. 32(9):1088–1090. doi:10.1094/MPMI-12-18-0352-A.

Gañán L, Álvarez E, Castaño Zapata J. 2015. 7 Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. Rev la Acad Colomb Ciencias Exactas, Físicas y Nat. 39(152):339. doi:10.18257/raccefyn.192.

García MC, Peña AC, Brito B. 2014. *Physalis peruviana* L.: Fruta Andina para el Mundo. 1ª. Colombia: CEBAS-CSIC. [accessed 2020 Oct 9]. [http://www.vidarium.org/wp-content/uploads/2017/05/cornucopia\\_2014.\\_uchuva\\_physalis\\_peruviana\\_1.\\_fruta\\_andina\\_para\\_el\\_mundo-min.pdf](http://www.vidarium.org/wp-content/uploads/2017/05/cornucopia_2014._uchuva_physalis_peruviana_1._fruta_andina_para_el_mundo-min.pdf).

Gijón AR, Pérez IM, Torres B, Rojas HV, Ortíz E. 2019. Identificación del agente causal de la antracnosis en el cultivo de hule [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.]. Rev Mex Ciencias For. 10(56). doi:10.29298/rmcf.v10i56.551.

Hassan O, Jeon JY, Chang T, Shin JS, Oh NK, Lee YS. 2018. Molecular and Morphological Characterization of *Colletotrichum* Species in the *Colletotrichum gloeosporioides* Complex Associated with Persimmon Anthracnose in South Korea. Plant Dis. 102(5):1015–1024. doi:10.1094/PDIS-10-17-1564-RE. [accessed 2020 Oct 28]. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1564-RE>.

Hanlin TR. 1998. Illustrated genera of Ascomycetes. Vol. I. USA: The American Phytopathological Society. USA. 118-119 pp.

Hyde KD, Cai L, Mckenzie EHC, Yang YL, Zhang JZ, Prihastuti H, Prihastuti JZ. 2009. 3 *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. Fungal Divers .

Incremona M. 2020. Caracterización morfológica, molecular y fisiológica del sistema *Colletotrichum*/*Glomerella* – *Glycine max* y su relación biológico epidemiológica

- con otros hospedantes en la zona productora núcleo de Argentina. FCA-UNR. [accessed 2020 Oct 14]. <http://rehip.unr.edu.ar/xmlui/handle/2133/18876>.
- Khodadadi, Fatemeh, Jonathan B. González, Phillip L. Martin, Emily Giroux, Guillaume J. Bilodeau, Kari A. Peter, Vinson P. Doyle, and Srđan G. Aćimović. 2020. "Identification and Characterization of Colletotrichum Species Causing Apple Bitter Rot in New York and Description of *C. Noveboracense* Sp. Nov." *Scientific Reports* 10 (1): 11043. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66761-9>.
- López N, Castaño J. 2013. Etiología de la muerte descendente del tomate de árbol [*Solanum betaceum* (CAV.) SENDT.]. *Agronomía*. 21(1):7–18.
- Macrogen. 2020. User Guide Secuenciación Sanger. Macrogen Online Seq Order Syst. [accessed 2020 Oct 20]. [https://dna.macrogen.com/pageLinkDnaSys.do?menuCd=SUP100200&layout=page\\_sub&link=%2Fsupport%2FretrieveGuideCes#none](https://dna.macrogen.com/pageLinkDnaSys.do?menuCd=SUP100200&layout=page_sub&link=%2Fsupport%2FretrieveGuideCes#none).
- Molina A, Gómez L, Umaña G. 2017. Identificación de especies del género *Colletotrichum* asociadas a la antracosis en papaya (*Carica papaya* L.) en Costa Rica. *Agron Costarric*. 41(1):69–80.
- Morales N, Cardona-Castro N. 2018. Métodos de diagnóstico en micología. *Ces Med*. 32(1):41–52. doi:10.21615/cesmedicina.32.1.5. [accessed 2020 Oct 19]. <http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/2605>.
- National Center for Biotechnology Information – NCBI (NCBI). 2020. Navegador de taxonomía (*Colletotrichum* sp.). [accessed 2020 Nov 5]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=34409>. Nieto D, Almaraz A, Ayala V, Orozco M, Lara FM. 2019. Primer reporte de *Colletotrichum coccodes* en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en México. *Rev Fitotec Mex* . 42(3):195–200. [accessed 2020 Oct 14].

<https://revfitotecnia.mx/index.php/RFM/article/view/40/30>.

- Nirenberg HI, Feiler U, Hagedorn G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *Mycologia*. 94(2):307–320. doi:10.1080/15572536.2003.11833238. [accessed 2020 Nov 13]. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15572536.2003.11833238>.
- Parra L. 2008. Relación entre infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango (*Mangifera indica* L) variedad hilacha [Tesis de pregrado]. [Bogotá (Colombia)]: Pontificia Universidad Javeriana .
- Pinzón AY. 2014. Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica [Tesis de postgrado]. [Bogotá (Colombia)]: Universidad Nacional de Colombia.
- Rojo-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R. 2017. Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Rev Mex Fitopatol Mex J Phytopathol*. 35(3):549–570. doi:10.18781/r.mex.fit.1703-9. [accessed 2020 Oct 26]. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092017000300549&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092017000300549&lng=es&nrm=iso&tlng=es).
- Pro Ecuador. 2020. Oferta de uvilla ecuatoriana en mercados potenciales. Viceministerio de Promoción de Exportaciones e Inversiones del Ecuador. [accessed 2021 Ene 11]. <https://www.proecuador.gob.ec/oferta-de-uvilla-ecuatoriana-en-mercados-potenciales-2020/>
- Promega. 2019. Technical manual: Wizard® Genomic DNA Purification: Isolation Genomic DNA from Plant Tissue. [accessed 2020 Oct 8]

<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?la=en>

- Réblová M, Gams W, Seifert A. 2011. Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. *Stud Mycol.* 68:163–191. doi:10.3114/sim.2011.68.07.
- Ruiz Gaitan M, Castellanos González L, Jair Villamizar C. 2018. El cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Rev Científica Agroecosistemas.* 6(1):46–53. [accessed 2020 Oct 8]. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/163/198>.
- Salazar E, Hernández R, Tapia A, Gómez-Alpízar L. 2012. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp) de altura en la zona de turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agron Costarric.* 36(1):53–68. [accessed 2020 Oct 20]. [www.mag.go.cr/revagr/index.html](http://www.mag.go.cr/revagr/index.html)[www.cia.ucr.ac.cr](http://www.cia.ucr.ac.cr).
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. 2019. Agenda Zonal ZONA 3-Centro. 1a ed. Proaño Cordero JC, Játiva MÁ, Argotty SK, Rivadeneira B, Oleas LA, Nataly Quiroz, García K, Guamanquispe G, Pérez S, Yépez J, et al., editors. Quito: Senplades . [accessed 2020 Oct 21]. [www.planificacion.gob.ec](http://www.planificacion.gob.ec).
- Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. 2014. Manual Técnico del Cultivo de Uchuva Bajo Buenas Prácticas Agrícolas. Medellín, Colombia: Francisco Vélez. [accessed 2020 Oct 9]. [https://issuu.com/linaknup/docs/manual\\_uchuva\\_final-baja\\_\\_caratula](https://issuu.com/linaknup/docs/manual_uchuva_final-baja__caratula).
- Sharma G, Maymon M, Freeman S. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Sci Rep.* 7(1):1–16. doi:10.1038/s41598-017-15946-w. [accessed 2021 Jan 16]. [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports).

- Shin JH, Han JH, Park HH, Fu T, Kim KS. 2019. Optimization of polyethylene glycol-mediated transformation of the pepper anthracnose pathogen *Colletotrichum scovillei* to develop an applied genomics approach. *Plant Pathol J.* 35(6):575–584. doi:10.5423/PPJ.OA.06.2019.0171.
- Servicio de Aduana del Ecuador SENA. 2021. Exportaciones FOB no petroleras exp-nov-2019 (versión Excel). [accessed 2021 Ene 12]. <https://www.aduana.gob.ec/exportaciones/#>
- de Silva DD, Groenewald JZ, Crous PW, Ades PK, Nasruddin A, Mongkolporn O, Taylor PWJ. 2019. Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia. *IMA Fungus.* 10(1):8. doi:10.1186/s43008-019-0001-y. [accessed 2020 Oct 28]. <https://imafungus.biomedcentral.com/articles/10.1186/s43008-019-0001-y>.
- Socay VA. 2017. Obtención de semilla de uvilla (*Physalis peruviana* L.) a través de dos métodos de extracción y cuatro sustratos para la producción de plantas en vivero [Tesis de pregrado]. [Riobamba (Ecuador)]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. [accessed 2020 Oct 21]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6650/1/13T0842.pdf>.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30(12):2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197. [accessed 2020 Oct 20]. [/pmc/articles/PMC3840312/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24541762/).
- Tapia A, Ramírez JF, Salgado ML, Castañeda Á, Maldonado FI, Lara A V. 2020. 2 Spatial distribution of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) in avocado in the State of Mexico, Mexico. *Rev Argent Microbiol.* 52(1):72–81. doi:10.1016/j.ram.2019.07.004.

- Thermo Fisher Scientific. 2010. Nucleic Acid Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. USA.
- Trillos González O, Cotes Torres JM, Medina Cano CI, Lobo Arias M, Navas Arboleda AA. 2008. Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en Antioquia (Colombia). *Rev Bras Frutic.* 30(3):708–715. [accessed 2020 Oct 18]. [https://www.academia.edu/6416576/Caracterización\\_morfológica\\_de\\_cuarenta\\_y\\_seis\\_accesiones\\_de\\_uchuva\\_Physalis\\_peruviana\\_L\\_en\\_Antioquia\\_Colombia](https://www.academia.edu/6416576/Caracterización_morfológica_de_cuarenta_y_seis_accesiones_de_uchuva_Physalis_peruviana_L_en_Antioquia_Colombia).
- Velázquez A, García SE, Robles L, Nava C, Nieto D. 2018. Primer reporte del género *Colletotrichum* spp. en frutos de pimienta gorda (*Pimenta dioica*) en Veracruz, México. *Rev Mex Fitopatol Mex J Phytopathol.* 36(2). doi:10.18781/r.mex.fit.1711-1.
- Waller JM, Lenné JM, Waller SJ. 2002. *Plant Pathologist's Pocketbook*. 3rd ed. Wallingford, UK: CABI.
- Weir BS, Johnston PR, Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol.* 73:115–180. doi:10.3114/sim0011.
- Wharton PS, Diéguez Uribeondo J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *An del Jardín Botánico Madrid.* 61(1):3–22. [accessed 2021 Jan 14]. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55661101>.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Nueva York (Estados Unidos): Academic Press.
- Yegneswaran P, Irinyi L, Halliday C, Chen S, Robert V, Meyer W. 2017. Online Databases for Taxonomy and Identification of Pathogenic Fungi and Proposal for a Cloud-Based Dynamic Data Network Platform. *J Clin Microbiol.* 55:1011–

1024. doi:10.1128/JCM.02084-16. [accessed 2020 Oct 20].  
<http://www.aspergillus>.

Zapata M, Opazo A. 2017. Detección de *colletotrichum pyricola* asociado a árboles urbanos de *Embothrium coccineum* en Chile. *Bosque*. 38(1):195–201. doi:10.4067/S0717-92002017000100019. [accessed 2021 Jan 20].  
[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-92002017000100019&lng=es&nrm=iso&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92002017000100019&lng=es&nrm=iso&tlng=en).

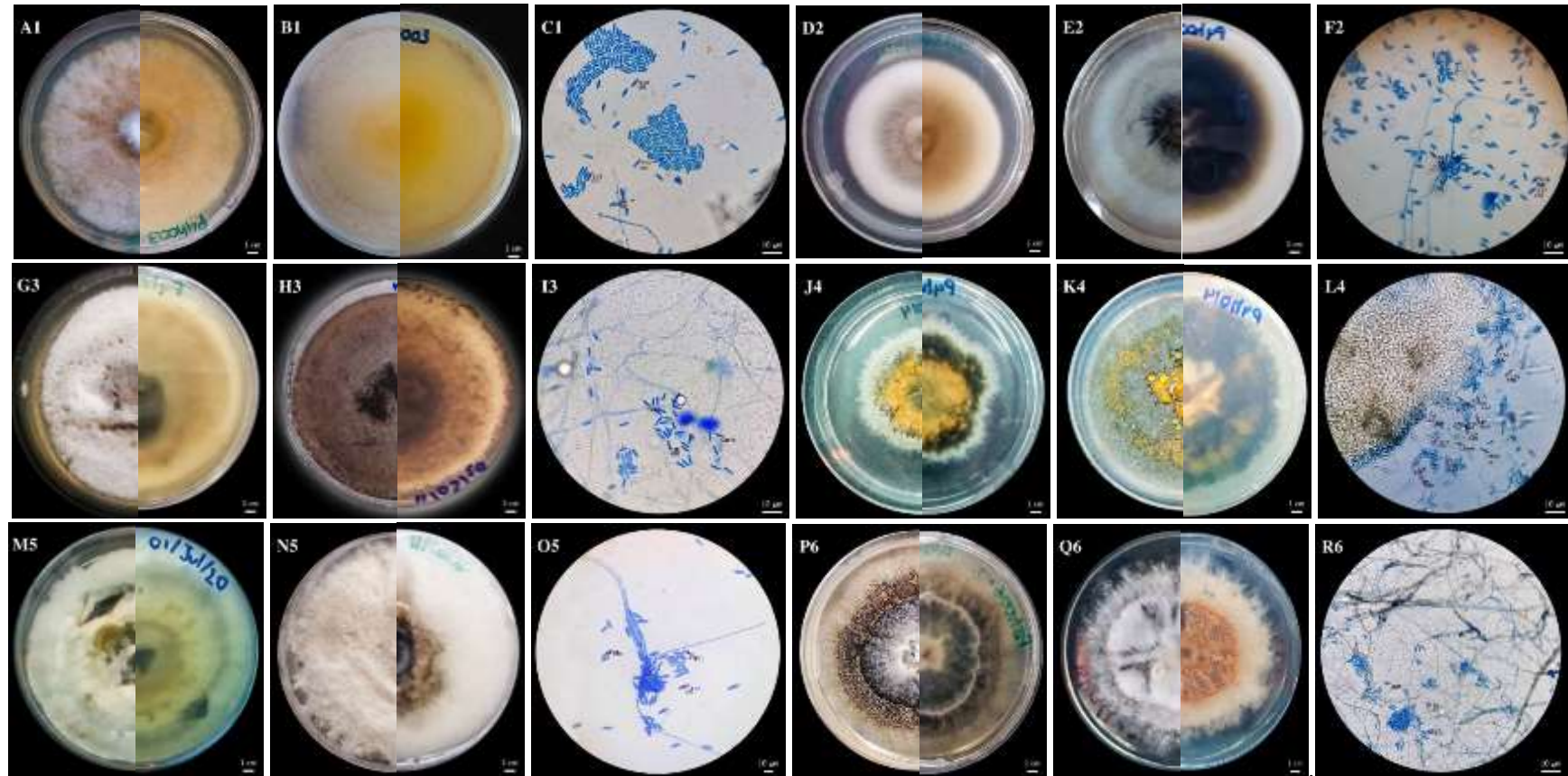
Zapata JL, Saldarriaga A, Londoño M, Díaz C. 2002. Manejo del Cultivo de la Uchuva en Colombia. Higuera J, editor. Rionegro, Antioquia - Colombia: Tiraje.

Zhang M, Seifert KA, Bennett JW, Cai Y. 2013. Impacts of the International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Melbourne Code) on the Scientific Names of Plant Pathogenic Fungi. APS.  
<https://www.researchgate.net/publication/237151839>.

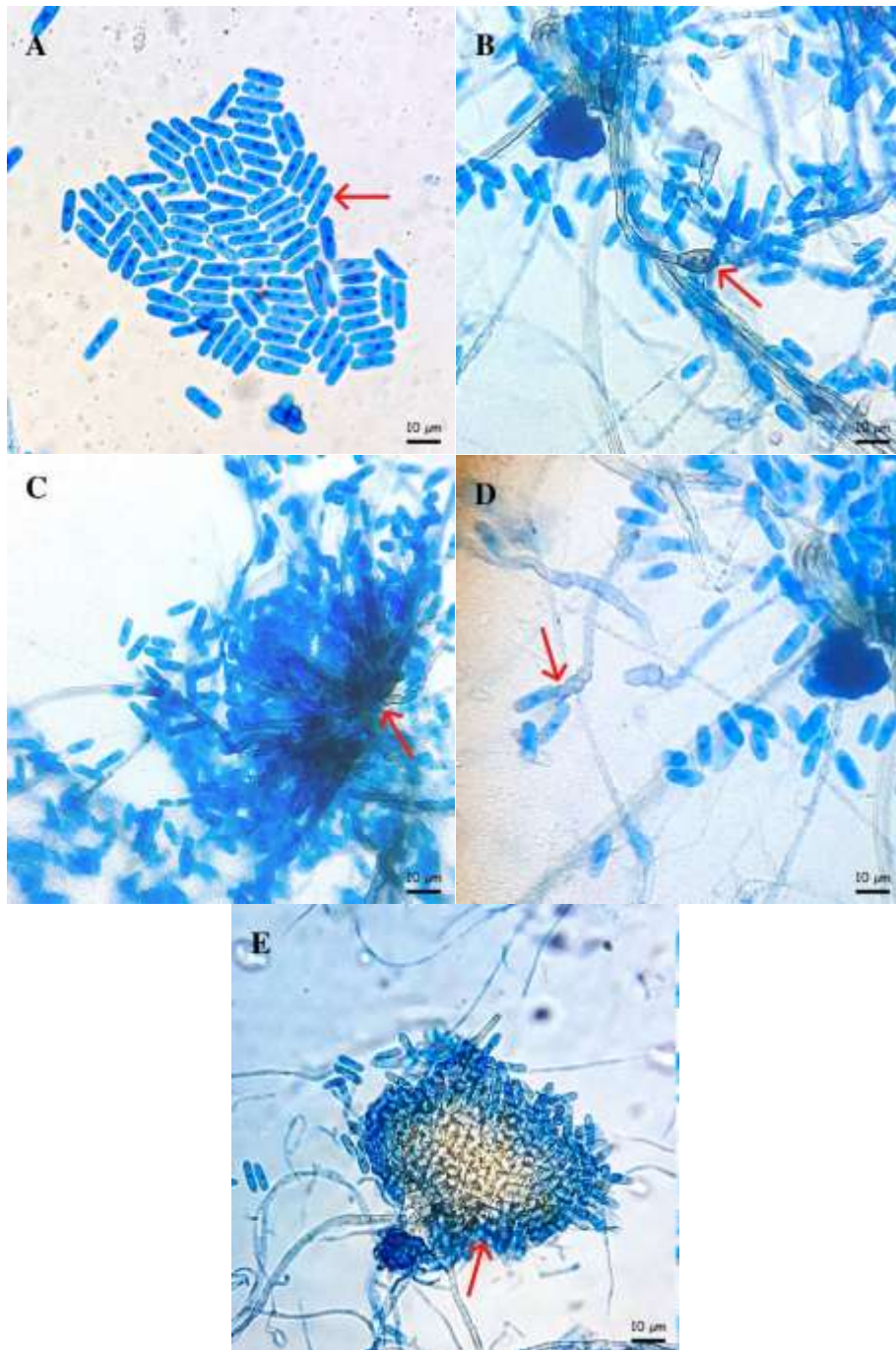
## FIGURAS



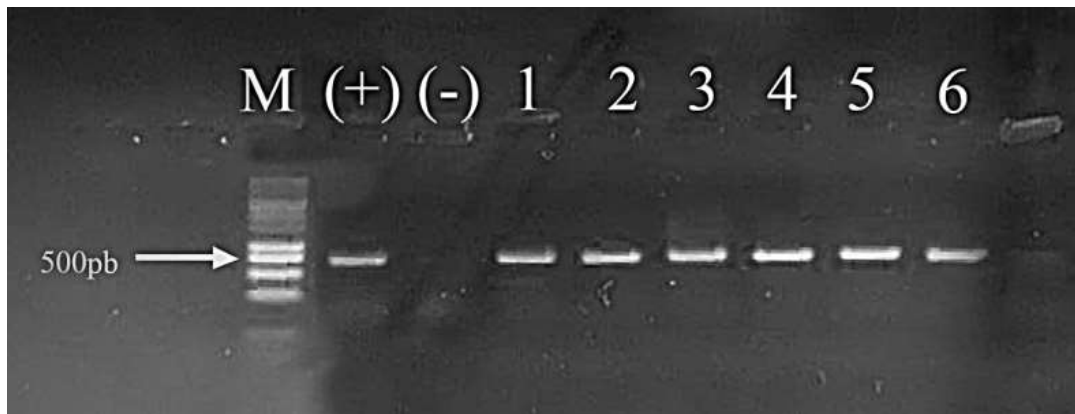
**Figura 1.** A) Vista panorámica de una parcela de uvilla. B-C-D) Hojas de uvillas en estados avanzados de la enfermedad (manchas necróticas, halos cloróticos y anillos concéntricos).



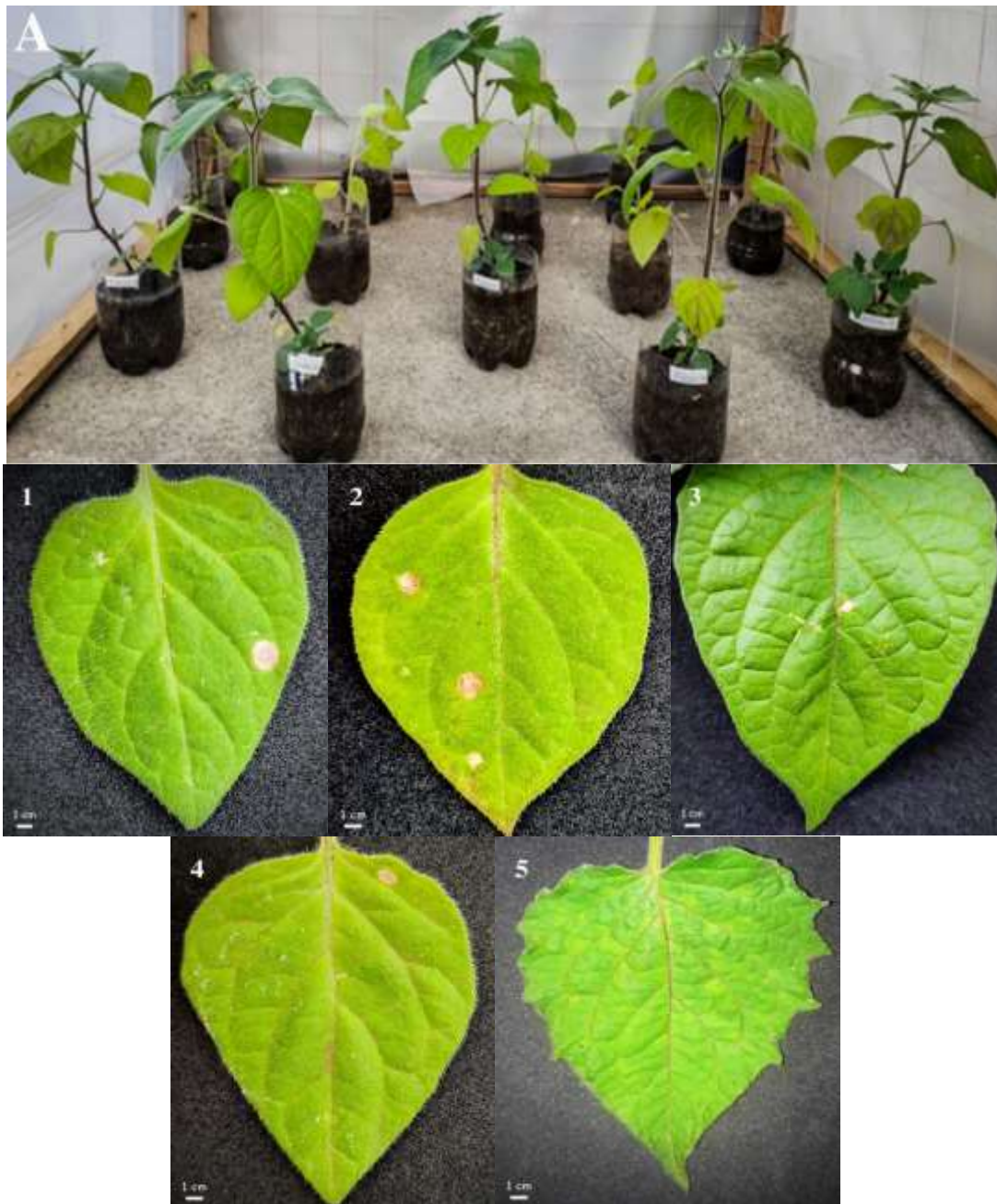
**Figura 2.** Observación macroscópica y microscópica de aislados presuntivos de *Colletotrichum* spp. (A.T 400X). Colonias en PDA, anverso y reverso (A1-D2-G3-J4-M5-P6); Colonias en MEA, anverso y reverso (B1-E2-H3-K4-N5-Q6). Conidias: C1) P4h003; F2) P4h010; I3) P4h011; L4) P4h014; Q5) P4h016; R6) P5h006-2.



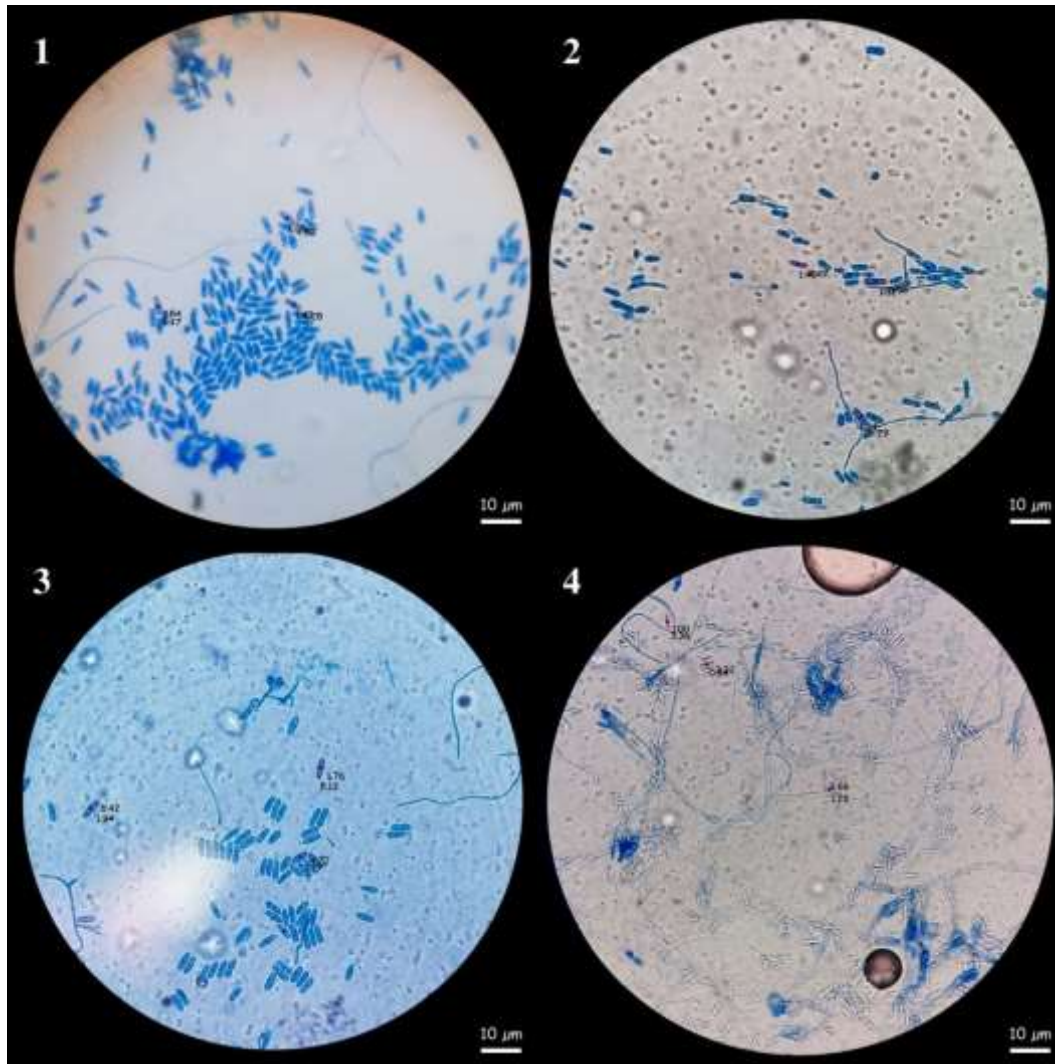
**Figura 3.** Estructuras microscópicas de *Colletotrichum* spp. (A.T. 400X). A) conidias, B) apesorio, C) bases de setas, D) conidióforo, E) acérvulo.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR a partir del ADN obtenido de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociado a la antracnosis en hojas de uvilla. M = marcador molecular 100pb; carril 1 a 6 aislados de hongos obtenidas de hojas; (+) = control positivo (*Phoma* sp.); (-) = control negativo (agua libre de nucleasas). 1) P4h003; 2) P4h010, 3) P4h011; 4) P4h014; 5) P4h016; 6) P5h006-2.



**Figura 5.** A) Vista panorámica de plántulas de uvilla infectadas con diferentes especies de *Colletotrichum* spp. en condiciones de invernadero (postulados de Koch). Hojas sintomáticas en etapa inicial de antracnosis (13 días después de la inoculación) 1) P4h003; 2) P4h014, 3) P4h016; 4) P5h006-2; 5) Control negativo



**Figura 6.** Conidias recuperadas en los postulados de Koch idénticas a los aislados originales (A.T 400X). 1) P4h003; 2) P4h014, 3) P4h016; 4) P5h006-2.

## TABLAS

**Tabla 1.** Aislados fúngicos colectados en Cotopaxi y Pichincha obtenidos a partir de plantas diferentes de *Physalis peruviana* L.

<b>CÓDIGO AISLADO</b>	<b>LOCALIZACIÓN (Zona - provincia)</b>	<b>TEJIDO AFECTADO</b>	<b>GEORREFERENCIA</b>	<b>ALTITUD (m s. n. m)</b>
<b>P4h003</b>				
<b>P4h010</b>				
<b>P4h011</b>	Pilaló, Cotopaxi	Hoja	0° 56' 47.089" N 78° 0' 59.693" W	2241
<b>P4h014</b>				
<b>P4h016</b>				
<b>P5h006-2</b>	San José de Minas, Pichincha	Hoja	0° 10' 7.491" N 78° 23' 59.586" W	2496

Código P4: parcela 4; P5: parcela 5; h: hoja; 000: número de muestra.

**Tabla 2.** Tamaño de estructuras microscópicas de cada aislado después de 15 días de crecimiento.

<b>CÓDIGO AISLADO</b>	<b>CONIDIAS (µm)</b>		
	<b>Largo</b>	<b>Ancho</b>	<b>Media</b>
P4h003	4,5 – 5,7	1,2 – 1,7	5 × 1.4
P4h010	4,4 – 5,8	1,4 – 1,9	5 × 1.6
P4h011	4 – 5,9	1,2 – 1,6	5 × 1.3
P4h014	4,7 – 5,5	1 – 1,9	5.1 × 1.4
P4h016	4,6 – 6,6	1,4 – 2	5.6 × 1.7
P5h006-2	3,4 – 4,2	0,9 – 1,4	3.8 × 1.1

µm: micrómetros.

**Tabla 3.** Identificación molecular de secuencias ITS de aislados fúngicos obtenidos de tejido foliar necrótico.

<b>CÓDIGO AISLADO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>ID SECUENCIA</b>	<b>PORCENTAJE COBERTURA (%)</b>	<b>PORCENTAJE IDENTIDAD (%)</b>
<b>P4h003</b>	<i>Colletotrichum fruticola</i>	MT626035.1 (GenBank)	100	99.26
		CBS 238.49 (Mycobank)	100	99.26
<b>P4h010</b>	<i>Colletotrichum scovillei</i>	MT645274.1 (GenBank)	100	98.30
		CBS 120708 (Mycobank)	97.16	98.83
<b>P4h011</b>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	MT557555.1 (GenBank)	100	100
		SH1543708.08FU (UNITE)	100	100
<b>P4h014</b>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AJ536229.1 (GenBank)	100	99.25
		CBS 953.97 (ISHAM)	100	99.25
<b>P4h016</b>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	MT645662.1 (GenBank)	100	97.44
		CBS 953.97 (ISHAM)	100	97.42
<b>P5h006-2</b>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	MT177219.1 (GenBank)	100	99.35
		CBS 369.75 (ISHAM)	100	99.35

**Tabla 4.** Sintomatología en hojas de uvilla post-infección, postulados de Koch.

<b>CÓDIGO AISLADO</b>	<b>MÉTODOS</b>			<b>DESCRIPCIÓN</b>
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	
<b>P4h003</b>	+	-	+	Lesión mediana, circular, color castaño y borde irregular con necrosis parcial
<b>P4h010</b>	-	-	-	Ningún cambio
<b>P4h011</b>	-	-	-	Ningún cambio
<b>P4h014</b>	+	+	+	Lesiones pequeñas, redonda, color marrón y borde irregular
<b>P4h016</b>	+	+	-	Lesión pequeña, circular, color castaño y borde
<b>P5h006-2</b>	+	-	-	Lesión pequeña, circular, color castaño y borde irregular
<b>Control (-)</b>	-	-	-	Ningún cambio

M1: inoculación por aspersion; M2: inoculación por laceración; M3: inoculación por inyección; (+): plántula sintomática; (-): plántula asintomática.

**Tabla 5.** Identificación molecular de secuencias ITS de los aislados fúngicos obtenidos en los postulados de Koch.

<b>CÓDIGO AISLADO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>ID SECUENCIA</b>	<b>PORCENTAJE COBERTURA</b>	<b>PORCENTAJE IDENTIDAD</b>
<b>P4h003</b>	<i>Colletotrichum fructicola</i>	MN378380.1(GenBank)	100	100
		SH1543705.08FU (UNITE)	100	100
<b>P4h014</b>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	MT071248.1 (GenBank)	100	100
		SH1543705.08FU (UNITE)	100	100
<b>P4h016</b>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	MN856240.1 (GenBank)	100	99.79
		SH1543705.08FU (UNITE)	100	99.79
<b>P5h006-2</b>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	MT221566.1 (GenBank)	100	100
		CBS 369.75 (ISHAM)	100	100