



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

FECHA DE PRESENTACIÓN: Abril, 2012

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Biotecnología y Fruticultura

PROYECTO: Mejoramiento de la productividad y calidad de la Fruticultura en la Región Litoral, Andina y Amazónica del Ecuador

ACTIVIDAD: Evaluación y selección *in vitro* de materiales promisorios de tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav.), resistentes/tolerantes a la antracnosis (*Colletotrichum spp*).

UBICACIÓN: Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglagua
Localidad: EESC

AUTOR: Egdo. Oscar Mauricio Miranda Buenaño

COAUTORES: Ing. Jacqueline Benítez
Dr. Eduardo Morillo
Dr. Wilson Vásquez

COLABORADORES: Departamento de Protección Vegetal

DURACIÓN: 12 meses

FECHA DE INICIO: Mayo/2012

FECHA DE TERMINACIÓN: Mayo/2013

PRESUPUESTO: \$ 5792.54

FINANCIAMIENTO: INIAP: 32.93%
TESISTA: 67.07%

1. ANTECEDENTES

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*, Cav.), es un frutal andino promisorio y de grandes oportunidades para los productores, gracias a que en los últimos años el consumo de tomate de árbol ha tenido un incremento sustancial. En el 2009, la demanda fue de 1,98 kg/persona/año, comparado con el 2006 que apenas fue de 0,90 kg/persona/año, para consumo en fresco y uso agroindustrial (Lucas *et al.*, 2010), consecuentemente se aprecia un incremento sostenido de la superficie cosechada, de 4062 ha en el 2002 a 7172 en el 2010, siendo las principales zonas de producción: Imbabura, Pichincha, Cotopaxí, Tungurahua y Azuay (MAGAP-INEC-ESPAC, 2010).

El incremento del área cultivada ha sido paulatino año tras año, no así los rendimientos que han mantenido tendencia a la baja, obteniéndose 13,8 t/ha en el 2002 y 5,5 t/ha en el 2010. Entre las causas principales de las pérdidas se encuentran problemas ocasionados por la susceptibilidad a enfermedades fúngicas. La antracnosis (*Colletotrichum spp.*) es una de las enfermedades más importantes. Este hongo está ampliamente distribuido en las zonas productoras y es considerado por muchos productores como el causante de la enfermedad más destructiva del cultivo, ocasionando pérdidas entre el 50 y 100% (INIAP, 2004), limitando de esta manera el cultivo en importantes áreas de producción, y obligando a los productores al establecimiento de huertos en superficies “libres” del patógeno, que en poco tiempo también son infectadas (Proaño, 2008).

Para poder enfrentar el aumento de la incidencia del hongo, es necesario aumentar la tolerancia de las plantas, mediante el desarrollo y utilización de material resistente (Duvick, 1999). Con estos antecedentes, en el Programa Nacional de Fruticultura del INIAP, esta realizando investigaciones enfocadas principalmente a establecer fuentes de resistencia a antracnosis. Para esto se ha procedido a identificar fuentes de resistencia, basados en estudios de mejoramiento genético realizados por CORPOICA con germoplasma de tomate de árbol y especies relacionadas, en los que encontraron genes de resistencia en la especie silvestre *Cyphomandra uniloba* y *C. materna* (Lobo *et al.*, 2000). Estos materiales se utilizaron en un plan de cruzamientos con variedades comerciales de tomate de árbol con el fin de combinar las mencionadas fuentes de resistencia para obtener líneas específicas y con características deseadas (Proaño, 2008).

En el Ecuador, en el 2008-2010 en la Granja Tumbaco del INIAP, se evaluaron y seleccionaron plantas de segregantes de cruzamientos interespecíficos entre *S. betaceum* por *C. uniloba* y *C. materna* por *S. betaceum*. Resultado de estas evaluaciones se dispone de 20 materiales promisorios, que tienen el potencial para desarrollar una variedad, que presentan resistencia/tolerancia a antracnosis y buena calidad de fruta (INIAP, 2009). Sin embargo su propagación no es fácil debido a su naturaleza alógama, existiendo una polinización cruzada del 40 al 60% (Bosh, 1994), que conduce a una disminución en la base genética traduciéndose en la pérdida de características deseadas (Tapia, 2004). Consecuentemente la biotecnología representa una alternativa por el potencial de conservar las características genéticas y calidad sanitaria de las plantas por medio de la técnica de cultivo de tejidos que permite obtener plantas idénticas a su progenitor, garantizando calidad genética, sanitaria y fisiológica (Olmos *et al.*, 2008; Lozada, 2010).

El mejoramiento genético clásico en los cultivos para incrementar resistencia a enfermedades fúngicas, el rendimiento y la calidad, ha jugado un papel preponderante como estrategia para generar nuevas variedades. No obstante, el crecimiento de la población mundial y el dinámico desarrollo de las plagas y enfermedades, han hecho que durante los últimos años, se haya considerado la importancia de integrar a los esquemas clásicos de investigación, técnicas modernas y métodos de la biotecnología como el cultivo de tejidos, la selección *in vitro*, la ingeniería genética y los marcadores moleculares, con la finalidad de acelerar el mejoramiento genético y contar con variedades sobresalientes (Ligarreto, 2001).

La selección *in vitro* como alternativa en la obtención de variedades resistentes a enfermedades se ha incrementado por el avance en los estudios tanto de los procesos de la planta y la biología de los patógenos, como del entendimiento de las interacciones planta-patógeno (Pérez, 1998). Se han

realizado estudios *in vitro* y se han encontrado diferencias entre variedades resistentes y susceptibles a determinadas enfermedades en condiciones *in vitro* en cultivos como: papa (*Solanum tuberosum* L), caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido), tomate (*Lycopersicon esculentum* L) (Alvarado *et ál.*, 2008). Por otro lado, desde el punto de vista práctico la utilización de la toxina o el filtrado del cultivo de hongos, elimina uno de los problemas encontrados cuando se trabaja con el patógeno in vivo como agente selectivo, los cultivos *in vitro* pueden ser expuesto fácil y uniformemente al agente selectivo, ya que estos pueden ser incorporados directamente bajo condiciones controladas (Kosky, 1998).

Para complementar el trabajo del Programa Nacional de Fruticultura en la evaluación de materiales promisorios de tomate de árbol resistentes/tolerantes a antracnosis, se evaluará *in vitro* la resistencia/tolerancia de siete materiales promisorios, con la finalidad de relacionar materiales que presentarán las características de resistencia/tolerancia a esta enfermedad.

2. JUSTIFICACIÓN

La falta de alternativas para el manejo de la antracnosis, es razón suficiente para continuar con las investigaciones desarrolladas por el Programa de Fruticultura del INIAP, que hasta el momento ha identificado y preseleccionado materiales promisorios, que resultaron ser resistentes/tolerantes a antracnosis. No obstante para el tomate de árbol los procedimientos de mejoramiento convencional no son sencillos de ejecutar debido a la polinización cruzada que dificulta mantener el genotipo selecto, por lo tanto, es necesario el estudio de técnicas de cultivo de tejidos que permitan obtener plántulas de calidad y con características idénticas a sus progenitores.

Los métodos convencionales de mejoramiento de la selección en campo que buscan resistencia a enfermedades son altamente demandantes de tiempo, costosos, y dependen de las fluctuaciones naturales en la abundancia del inóculo, además el principal inconveniente es la dispersión del patógeno, la infección, el desarrollo y expresión de la enfermedad lo que puede influir en la manifestación de una falsa resistencia. Por otro lado, la selección *in vitro* puede ofrecer una alternativa, debido a que es una técnica donde se puede mantener unidades experimentales bajo ambientes definidos y rigurosamente controlados que permiten identificar de manera eficiente la resistencia a la enfermedad, por la cualidad de exponer directamente sin interacción con otros factores los agentes infectivos a parte que requiere menos esfuerzo y una menor implementación logística, por consiguiente la alternativa planteada para continuar con el proceso de evaluación de la resistencia de los materiales promisorios de tomate de árbol es mediante técnicas de selección *in vitro* pues con esta técnica se puede examinar a mayor profundidad la interacción planta-patógeno y el progreso de la resistencia.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar y seleccionar *in vitro* materiales promisorios de tomate de árbol (*Solanum betaceum*, Cav.), resistentes/tolerantes a *Colletotrichum* spp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la respuesta de materiales promisorios de tomate de árbol a dos medios de cultivo para obtener la mayor tasa de multiplicación en laboratorio
2. Seleccionar *in vitro* los materiales promisorios de tomate de árbol con mayor grado de resistencia/tolerancia al ataque de *Colletotrichum* spp.
3. Evaluar la respuesta de materiales promisorios de tomate de árbol a dos medios de enraizamiento para la obtención de plántulas completas en laboratorio.

4. HIPÓTESIS

H_0 = No existe respuesta favorable a los medios de cultivo para la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de los materiales promisorios de tomate de árbol.

H_0 = No existe resistencia/tolerancia de los materiales de tomate de árbol a las cepas de *Colletotrichum spp.*, evaluados a nivel de laboratorio

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Materiales biológicos

- Brotes tiernos de siete materiales promisorios y una variedad comercial de tomate de árbol.
- Inóculos de *Colletotrichum spp.*

5.1.2 Materiales de campo

- Tijera de podar
- Fundas plásticas y Ziploc.
- Papel absorbente

5.1.3 Materiales de laboratorio

- Agitador
- Agua destilada estéril
- Alcohol
- Bisturís y Pinzas
- Cinta rollopac y parafilm
- Frascos de vidrio
- Mechero
- Pipeta y Micropipeta
- Probetas
- Tubos de ensayo
- Cámara de Neubauer
- Triángulos de vidrio
- Microscopio

5.1.4 Reactivos

- Medio Murashige y Skoog (MS)
- Ácido ascórbico.
- Pantotenato de Calcio.
- 6-Benzilamino purina (BAP).
- Ácido Naftalenacético (ANA).
- Hipoclorito de Sodio.
- Ácido indolbutírico (IBA)
- Tween 20.
- Ácido Giberélico (GA3).
- Azúcar.
- Agar-Papa-Dextrosa (PDA)
- Phytigel.
- Ácido láctico

5.1.5 Equipos de laboratorio

- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cuarto de crecimiento
- Dispensador de medio
- pH metro
- Plato de agitación
- Refrigerador
- Vortex

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Características de los sitios experimentales

5.2.1.1 Ubicación

El estudio se realizará en los laboratorios del Dpto. de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Mejía parroquia Cutuglagua. El material de tomate de árbol será provisto por el Programa Nacional de Fruticultura.

5.2.1.2 Condiciones específicas del laboratorio

Temperatura promedio	: 20±2°C
Horas Luz	: 16
Intensidad luminosa	: 2000-3000 lux
Humedad relativa	: 80 %

5.3 Fases de la Investigación.

5.3.1 Fase I Establecimiento y multiplicación *in vitro* de materiales promisorios de tomate de árbol a través de técnicas de cultivo de tejidos

5.3.1.1 Factores en Estudio

5.3.1.1.1 Materiales promisorios de tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav)

- S1 = Segregante No-4
- S2 = Segregante No-6
- S3 = Segregante No-7
- S4 = Segregante No-9
- S5 = Segregante No-11
- S6 = Segregante No-14
- S7 = Segregante No-18
- S8 = Testigo (Anaranjado gigante).

Fuente: (Proaño, 2008)

5.3.1.1.2 Medio de cultivo selectivo¹

M1= M&S + BAP (0.25mg/l) + GA3 (0.20mg/l) + Pantotenato de Ca (2mg/l) + Sacarosa (30g/l) + Phytigel (3.5g/l)

M2=M&S + BAP (0.4mg/l) + GA3 (0.6mg/l) + ANA (0.2mg/l) + Tiamina (0.4mg/l) + Sacarosa (20g/l) + Phytigel (3.5g/l)

Fuente: (Navarro, 2005)

¹M&S: Sales de Murashige&Skoog; GA3: Acido Giberélico; BAP: 6-Benzilamino purina; ANA: ácido naftalenacético

5.3.1.2 Tratamientos

Cuadro 1. Tratamientos para la determinación de un medio de cultivo para inducción de brotes *in vitro* de materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP, Cutuglagua – Pichincha. 2012.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	S1M1	Segregante No- 4 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T2	S1M2	Segregante No- 4 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T3	S2M1	Segregante No- 6 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T4	S2M2	Segregante No- 6 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T5	S3m1	Segregante No- 7 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T6	S3M2	Segregante No- 7 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T7	S4M1	Segregante No- 9 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T8	S4M2	Segregante No- 9 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T9	S5M1	Segregante No- 11 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T10	S5M2	Segregante No- 11 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T11	S6m1	Segregante No- 14 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T12	S6M2	Segregante No- 14 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa - Phytigel
T13	S7M1	Segregante No- 18 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca - Sacarosa + Phytigel
T14	S7M2	Segregante No- 18 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa - Phytigel
T15	S8M1	Segregante Testigo Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T16	S8M2	Segregante Testigo Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa - Phytigel

5.3.1.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estará conformada por un tubo de ensayo de 2.0 cm de diámetro y 15 cm de alto, conteniendo un explante proveniente de yemas axilares o apicales jóvenes de cada uno de los materiales promisorios y una variedad comercial de tomate de árbol destinados para la investigación.

5.3.1.4 Diseño Experimental

Se utilizará un diseño completamente al azar (DCA), dispuesto en arreglo factorial 2x8 con 5 observaciones por tratamiento.

5.3.1.5 Análisis Estadístico

Cuadro 2. ADEVA para la evaluación de medios de inducción de brotes para materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012

Fuente de Variación (FV)	Grados de Libertad (GL)
Total	79
Tratamientos	15
Segregantes (S)	7
Medios de Cultivo (M)	1
S x m	7
Error Experimental	64

5.3.1.6 Análisis Funcional

Se realizará la prueba de Tukey al 5%, para tratamientos, segregantes e interacción (SxM) y DMS para medios de cultivo de las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas. El coeficiente de variación (CV) se expresará en porcentaje.

5.3.1.7 Variables a evaluar

5.3.1.7.1 Necrosis/oxidación (%)

Se establecerá mediante la relación porcentual entre el número de explantes necrosados y/u oxidados y el número total de explantes sembrados en medio de cultivo (MC). Se evaluará a los 30 días.

$$\text{Necrosis/Oxidación} = \frac{\text{Nro. de explantes necrosados/oxidados}}{\text{Nro. de explantes sembrados en MC}} \times 100$$

5.3.1.7.2 Contaminación (%)

Se establecerá mediante la relación entre el número de explantes contaminados y el número total de explantes sembrados en medio de cultivo (MC). Se evaluará a los 15 días.

$$\text{Contaminación} = \frac{\text{Nro. de explantes contaminados}}{\text{Nro. de explantes sembrados en MC}} \times 100$$

5.3.1.7.3 Explantes vivos (%)

Se establecerá mediante la relación entre el número de explantes vivos y el número total de explantes sembrados en el medio de cultivo (MC). Se evaluará a los 30 y 45 días.

$$\text{Explantes vivos} = \frac{\text{Nro. de explantes regenerados vivos}}{\text{Nro. de explantes sembrados en MC}} \times 100$$

5.3.1.7.4 Explantes con brotes (%)

Se establecerá el porcentaje de explantes con yemas brotadas mediante la relación entre el número de explantes que presenten brotes y el número total de explantes sembrados en medio de cultivo (MC). Se evaluará a la 30 y 45 días.

$$\text{Brotes} = \frac{\text{Nro. de explantes con brotes regenerados}}{\text{Nro. de explantes sembrados en MC}} \times 100$$

5.3.1.7.5 Tasa de multiplicación de explantes

Para el cálculo de la tasa de multiplicación (TM), se tomarán en cuenta el número total de explantes y/o brotes que se transfirieron de un subcultivo a otro y en todo el proceso de multiplicación. Se evaluará cada 30 días.

$$TM = \frac{\text{Nro. total de brotes transferidos}}{\text{Nro. total de brotes introducidos anteriormente}} \times 100$$

5.3.1.7.6 Longitud del explante (mm)

Se determinará la longitud de cada explante regenerado y se obtendrá un promedio de la longitud de explantes por cada tratamiento. Se evaluará a los 30 y 45 días.

5.3.1.8 Manejo específico del experimento

5.3.1.8.1 Obtención del material

El material a evaluar será colectado de los materiales promisorios de tomate de árbol existentes en el Programa Nacional de Fruticultura en la Granja Experimental Tumbaco. Los explantes colectados en invernadero serán colocados en papel húmedo y almacenados en una funda plástica con cierre hermético para evitar la deshidratación hasta ser trasladada al laboratorio

5.3.1.8.2 Introducción del material a condiciones *in vitro*

En esta etapa los materiales seleccionados serán sometidos a un proceso de desinfección descrito por Navarro (2005) para tomate de árbol (Anexo I). Posteriormente, bajo condiciones de flujo laminar se procederá a eliminar las hojas y las áreas necrosadas por efecto de la desinfección, con la ayuda de un bisturí y pinzas estériles hasta obtener ápices caulinares de 0.7 a 1.0 cm de longitud, que comprende el meristemo, los primordios foliares y las primeras hojas en desarrollo. Posteriormente, se sembrarán en los medios descritos para la investigación, para la introducción y multiplicación *in vitro* de tomate de árbol. La descripción de los medios se detalla en el Anexo II

5.3.1.8.3 Incubación

Los tubos de ensayo sembrados se colocarán en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 20±2°C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante siete semanas.

5.3.2 Fase II. Selección de los materiales promisorios de tomate de árbol para determinar la resistencia a antracnosis a través de la inoculación de *Colletotrichum spp.*

5.3.2.1 Factores en Estudio

5.3.2.1.1 Segregantes de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav)

S1 = Segregante No-4
S2 = Segregante No-6
S3 = Segregante No-7
S4 = Segregante No-9

S5 = Segregante No-11
S6 = Segregante No-14
S7 = Segregante No-18
S8 = Testigo (Anaranjado Gigante)

5.3.2.1.2 Cepas del Hongo

H1=*Colletotrichum gloeosporioides*

H2=*Colletotrichum acutatum*

5.3.2.2 Tratamientos

Cuadro 3. Tratamientos para inoculación de dos cepas de *Colletotrichum spp* en siete segregantes y una variedad comercial anaranjado gigante (testigo) de tomate de árbol. INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012

Tratamiento	Código	Descripción
T1	S1H1	Segregante No- 4. Inoculado con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
T2	S1H2	Segregante No- 4. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T3	S2H1	Segregante No- 6. Inoculado con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
T4	S2H2	Segregante No- 6. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T5	S3H1	Segregante No- 7. Inoculado con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
T6	S3H2	Segregante No- 7. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T7	S4H1	Segregante No- 9. Inoculado con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
T8	S4H2	Segregante No- 9. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T9	S5H1	Segregante No- 11. Inoculado con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
T10	S5H2	Segregante No- 11. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T11	S6H1	Segregante No- 14. Inoculado con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
T12	S6H2	Segregante No- 14. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T13	S7H1	Segregante No- 18. Inoculado con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
T14	S7H2	Segregante No- 18. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T15	S8H1	Segregante testigo. Inoculado con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
T16	S8H2	Segregante testigo. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>

5.3.2.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estará conformada por un frasco de vidrio en el cual se sembrarán cuatro explantes provenientes de los materiales promisorios de tomate de árbol regenerados en la primera fase para su posterior inoculación con el hongo *Colletotrichum spp*.

5.3.2.4 Diseño Experimental

Se utilizará un diseño completamente al azar (DCA), dispuesto en arreglo factorial 8x2 con 3 observaciones por tratamiento.

5.3.2.5 Análisis Estadístico

Cuadro 4. ADEVA para la selección de materiales promisorios de tomate de árbol resistentes/tolerantes a la inoculación de 2 cepas del hongo *Colletotrichum spp*. INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012

Fuente de Variación (FV)	Grados de Libertad (GL)
Total	47
Tratamientos	15
Segregantes (S)	7
Cepas del hongo (H)	1
S x H	7
Error Experimental	32

5.3.2.6 Análisis Funcional

Se realizará la prueba de Tukey al 5%, para tratamientos, segregantes e interacción (SxH) y DMS para cepas del hongo de las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas. El coeficiente de variación (CV) se expresará en porcentaje.

Se calcularán los promedios de los materiales promisorios de acuerdo con el porcentaje de sobrevivencia después de la interacción con el hongo. Las interacciones serán evaluadas de acuerdo con la escala de calificación definida por Granados (1988), que se detalla en la tabla No-1 y Anexo III.

Tabla 1. Compatibilidad Hongo/Cultivar

INTERACCIÓN	CLASE	DESCRIPCION
INCOMPATIBLE	1	Sin daño (sana)
	2	Daño ligero
TOLERANTE	3	Daño medio
COMPATIBLE	4	Muy dañada
	5	Daño severo o total

El tipo de interacción se clasificará como incompatibilidad (resistencia) en caso de que los cultivares presenten los síntomas de los niveles 1, 2 y la reacción será clasificada de compatibilidad (susceptibilidad) cuando presenten los síntomas de los niveles 4-5. El nivel 3 tolerancia será considerado en caso de que los cultivares presenten un nivel medio de resistencia. Se determinará el porcentaje de las interacciones compatibles e incompatibles, de acuerdo al nivel de susceptibilidad de los materiales promisorios y de la agresividad del inóculo de *Colletotrichum spp* a la dilución de 1×10^5 conidias/ml propuesta para la investigación comparado con el porcentaje de interacciones del testigo. La dilución fue seleccionada de acuerdo a pruebas de patogenicidad realizadas en investigaciones anteriores (Contreras, 2006).

5.3.2.6 Variables a evaluar

5.3.2.6.1 Iniciación de síntomas de antracnosis (días)

Se registrará el número de días que transcurran desde la inoculación de los explantes hasta el apareamiento de los primeros síntomas (necrosis) de la enfermedad en hojas y/o tallos. Los primeros síntomas se considerarán cuando se observen pequeñas manchas o depresiones.

5.3.2.6.2 Iniciación de signos de la enfermedad (días)

Se registrará el número de días que transcurran desde la inoculación hasta el apareamiento de los primeros signos de la enfermedad en los explantes. Es decir cuando se observe la esporulación del hongo característica constituida de un polvillo rosado salmón.

5.3.2.6.3 Incidencia de la enfermedad (%)

Durante el crecimiento del explante, en cada frasco, se contabilizará el número de explantes que presenten la enfermedad, además se obtendrá el porcentaje de explantes infectados en relación al total de explantes inoculados. Las lecturas se realizarán cada 15 días para determinar la curva de evolución de la enfermedad.

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Suma de explantes enfermos}}{\text{Suma total de explantes}} \times 100$$

5.3.2.7 Manejo específico del experimento

5.3.2.7.1 Preparación del material vegetal *in vitro* para determinar la resistencia a *Colletotrichum spp.*, en materiales promisorios de tomate de árbol.

Para preparar el material vegetal para la inoculación *in vitro* se trasladará el material sano y libre de contaminación de los tubos de ensayo a frascos de vidrio de un diámetro de 10cm. con medio básico de cultivo M&S. Cada frasco constará de cuatro cortes de yemas adventicias o axilares, con un espacio de separación de 2 a 3 cm., entre cortes y entre paredes internas del frasco. Las condiciones de crecimiento *in vitro* serán de 20° C, 16 horas luz y 8 de oscuridad. Las plantas que presentan buen crecimiento y de 2 a 3 hojas serán usadas para la inoculación.

5.3.2.7.2 Recolección de muestras

Los aislamientos se obtendrán a partir de frutos infectados de tomate de árbol muestreados en campo, y que presenten lesiones típicas de la antracnosis. Las muestras serán colectadas en la provincia de Pichincha sector Tumbaco donde se reporta incidencia del patógeno. Para su recolección se utilizarán fundas plásticas selladas, las cuales se identificarán y almacenarán, para su posterior traslado al laboratorio.

5.3.2.7.3 Aislamiento de la cepa

Para realizar esta investigación se utilizará cepas del hongo causante de la antracnosis (*Colletotrichum spp*), muestreadas en campo, aisladas y purificadas en el laboratorio de Biología Molecular del DNB, con la colaboración del Departamento de Protección Vegetal. Para el aislamiento del hongo, a partir de frutos infectados, se prepararán pequeñas secciones de tejido semiafectado de aproximadamente 0.3 cm², las cuales serán desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante dos minutos con el fin de eliminar la flora normal presente en el tejido, e inmediatamente se enjuagarán con agua destilada esterilizada. En la cámara de flujo laminar se depositarán cinco pedazos en forma equidistante en cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) que mantiene un pH 5.6. Las cajas petri se sellarán con parafilm e etiquetarán y por último se transferirán a una cámara de crecimiento a 24 °C en oscuridad durante 5 - 8 días hasta observar el desarrollo de las colonias del hongo.

5.3.2.7.4 Purificación de la cepa

Transcurridos los ocho días se procederá a seleccionar las mejores colonias, en base a características macroscópicas como el color, que debe presentarse gris claro en el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* y rosado o salmón para *C. acutatum*, la forma del micelio, típicamente velloso e inmerso en el medio de cultivo; y microscópicas como la forma de las conidias, que deben ser cilíndricas. Identificado la esporulación, se procederá a realizar un cultivo monospórico, sembrando en una caja con PDA una suspensión diluida de conidias para obtener colonias que se originan de una sola conidia, lo que se logrará seleccionando a través de un estereomicroscopio esporas individuales. Los aislamientos monospóricos serán multiplicados en PDA para la inoculación.

5.3.2.7.5 Identificación molecular del género *Colletotrichum spp.*

Aislado, purificado y reconocido el género *Colletotrichum spp.* se identificará la especie con la que contamos, mediante técnicas de identificación molecular. Para establecer si las cepas corresponden a la especie *gloeosporioides* o *acutatum* que son las de mayor incidencia en el tomate de árbol. La metodología a utilizar es la reportada por Afanador *et al* (2006); Brown *et al* (1996). Anexo V.

5.3.2.7.6 Preparación de la concentración del inóculo

A partir de un cultivo de *Colletotrichum spp.*, puro en caja, el inóculo se preparará añadiendo agua destilada a las cajas petri y raspando las conidias con una espátula, luego se determinará la concentración de esporas de la suspensión en una cámara de Neubauer y se disolverá en 9mL de agua destilada estéril, obteniéndose así una solución madre de la cual se derivarán la dilución de 1×10^5 conidias/ml. (Contreras, 2006).

5.3.2.7.7 Inoculación

Para la inoculación *in vitro*, dos hojas de cada planta serán inoculadas mediante una pipeta de 10 μ L. Se colocará una gota por hoja de una suspensión de conidias/ml, sobre el lado adaxial. Una vez realizada la inoculación, las plántulas se colocarán por tres días en cámara de incubación a una temperatura de 20-22 °C y a una humedad relativa sobre el 90%. Siete días después de la inoculación se realizará la evaluación. La preparación del inóculo y la inoculación serán desarrolladas en condiciones estériles. Los frascos con las plantas inoculadas *in vitro* serán incubadas en una cámara con 16 horas de luz y 8 de oscuridad a 16° C. Se anotarán los resultados de resistencia y susceptibilidad a los 6 u 8 días post-inoculación.

5.3.2.8. Evaluación de la resistencia

Se evaluará el grado de infección que presentan los explantes y de acuerdo a la tabla No-1 se determinará el material con mayor grado de resistencia en base a la sintomatología que presenten.

5.3.3 Fase III. Inducción de raíces en materiales promisorios de tomate de árbol, seleccionados en función de su resistencia/tolerancia a *Colletotrichum spp.*

Considerando que la bibliografía menciona que el tomate de árbol es una especie que no presenta inconvenientes el momento del enraizamiento *in vitro* y por cuestiones de presupuesto, esta fase contemplará el manejo de dos materiales promisorios que presenten las mejores características de resistencia/tolerancia a antracnosis con la finalidad de establecer el medio indicado para obtener una mayor tasa de enraizamiento.

5.3.3.1 Factores en Estudio

5.3.3.1.1 Segregantes de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav)

S1 = Segregante No-1

S2 = Segregante No-2

5.3.1.1.2 Medio de Enraizamiento²

E1= M&S + IBA (0.5mg/l) + Sacarosa (30g/l) + Phytigel (3.5g/l)

E2= M&S + IBA (1.0mg/l) + Sacarosa (30g/l) + Phytigel (3.5g/l)

Fuente: Benítez, (2012).⁵

5.3.3.2 Tratamientos

Cuadro 5 Tratamientos para la determinación de un medio de cultivo para inducción de raíces *in vitro* de materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	S1E1	Segregante seleccionado No-1 Cultivado en: M&S + IBA (0.5mg/l) + Azúcar (30g/l) + Phytigel (3.5g/l).
T2	S2E1	Segregante seleccionado No-2 Cultivado en: M&S + IBA (0.5mg/l) + Azúcar (30g/l) + Phytigel (3.5g/l).
T3	S1E2	Segregante seleccionado No-1 Cultivado en: M&S + IBA (1.0mg/l) + Azúcar (30g/l) + Phytigel (3.5g/l).
T4	S2E2	Segregante seleccionado No-2 Cultivado en: M&S + IBA (1.0mg/l) + Azúcar (30g/l) + Phytigel (3.5g/l).

² M&S: Sales de Murashige&Skoog, IBA: Ácido indolbutírico

⁵ Benítez, J. 2012. Responsable del Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Dpto. de Biotecnología INIAP. Com. Pers.

5.3.3.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estará conformada por un tubo de ensayo de 2.0 cm de diámetro y 15 cm de alto, conteniendo un brote de cada uno de los materiales promisorios de tomate de árbol seleccionados.

5.3.3.4 Diseño Experimental

Se utilizará un diseño completamente al azar (DCA), dispuesto en arreglo factorial 2x2 con 10 observaciones por tratamiento.

5.3.3.5 Análisis Estadístico

Cuadro 6. ADEVA para la evaluación de dos medios de enraizamiento para materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012

Fuente de Variación (FV)	Grados de Libertad (GL)
Total	39
Tratamientos	3
Segregantes S	1
Medios de enraizamiento E	1
S x E	2
Error Experimental	36

5.3.3.6 Análisis Funcional

Se realizará la prueba de Tukey al 5%, para tratamientos y DMS para medios de cultivo, segregantes e interacción SxE de las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas. El coeficiente de variación (CV) se expresará en porcentaje.

5.3.3.7 Variables a evaluar

5.3.3.7.1. Número de brotes con emisión de raíces (%)

Se contabilizará el número de plántulas que desarrollen raíces a los 30 y 45 días de haber sido sembrado el brote en medio de enraizamiento (ME).

$$\text{Brotos con raíces} = \frac{\text{Nro. brotes con emisión de raíces}}{\text{Nro. de brotes sembrados en ME}} \times 100$$

5.3.3.7.2 Longitud de raíces (mm)

Se determinará la longitud de la raíz principal a los 30 y 45 días haber sido sembrado el brote en medio de enraizamiento. Se utilizará una regla milimetrada, y la medida se expresará en milímetros.

5.3.3.7.3 Número de raíces

Se contará el número de raíces de cada brote, a los 30 y 45 días de haber sido sembrados.

5.3.3.8 Manejo Específico del Experimento

5.3.3.8.1 Transferencia de brotes

Finalizado el establecimiento y multiplicación de brotes, estos serán cultivados en medio básico M&S, sin hormonas, para reducir la concentración hormonal presente en el tejido. Se realizarán subcultivos a las 4 semanas a medios frescos de igual composición química, durante dos meses.

5.3.3.8.2 Sembrado de brotes

Los brotes obtenidos de los materiales promisorios de tomate de árbol seleccionados serán cultivados en medios de enraizamiento, los cuales serán un medio básico M&S, suplementado con dos concentraciones de Ácido indolbutírico (IBA). (Anexo IV). El pH del medio se ajustará a 5.7 y posteriormente, se esterilizará en autoclave a 121°C y 15 PSI (1.5Kg cm-2) de presión durante 20 minutos.

5.3.3.8.3 Incubación

Los tubos sembrados se colocarán en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 16 horas luz de fotoperiodo, durante 30 días.

7. PRESUPUESTO.

Cuadro 7. Personal

Rubro	Descripción	Precio Unitario	Cantidad	Total
Tesista	Mensual	323.80	12	3885.6
			Subtotal	3885.6

Cuadro 8. Reactivos

Rubro	Descripción	Precio Unitario	Cantidad	Total
Medio M&S	50 litros	260	1	260
Phytigel	g	0.50	120	60
Tiamina	mg	0.48	25	12
6-Benciladenina (BAP)	mg	0.18	200	36
Alcohol	gal	5.6	10	56
Hipoclorito de sodio	gal	11	1	11
Tween 20	ml	0.60	15	9
Ácido ascórbico	g	0.9	40	36
Benomil	Kg	12	1	12
Jabón líquido	Unidad	2.5	1	2.5
Povidin	Unidad	1.50	2	3
Azúcar	Kg	1.2	2	2.4
Agar-Papa-Dextrosa (PDA)	g	0.45	100	45
Ácido Indolbutírico (IBA)	mg	0.40	50	20
Ácido Giberélico (GA3)	mg	0.12	300	36
Pantotenato de Calcio	g	7.0	5	35
Ácido Naftalenacético (ANA)	mg	0.10	100	9
			Subtotal	644.90

Cuadro 9. Materiales de Laboratorio

Rubro	Descripción	Precio Unitario	Cantidad	Total
Hojas de Bisturí No- 11	Caja	30	1	30
Marcadores	Unidad	2.0	2	4
Mecheros de Alcohol	Unidad	4	1	4
Pinzas	Unidad	15	2	30
Probeta graduada 100ml	Unidad	16,4	1	16.4
Jeringuilla 10 ml	Unidad	0.25	5	1.25
Tijeras	Unidad	2	1	2
Cinta autoclavable	Rollo (50M)	21	0.5	11
Frascos de vidrio 5,6*9,0 cm.	Unidad	0.5	50	25
Parafilm	Unidad	35	0.5	17.5
Guantes de Nitrilo	Caja	12	1	12
Tubos de ensayo	Unidad	1.20	60	72
Papel absorbente	Paquete	15	1	12
Papel aluminio	Paquete	4	2	8
Servilletas	Paquete	1.2	3	3.6
Rolopac	Paquete	3.25	3	9.75
Mascarilla	Unidad	0.25	10	2,5
Cajas Petri	Unidad	1.10	10	11
Fundas Ziploc	Paquete de 20	2.6	2	5.2
			Subtotal	277.20

Cuadro 10. Análisis Molecular

Rubro	Descripción	Precio. U	Cantidad	Total
Extracción de ADN (1-36 muestras)	Análisis	15	2	30
Cuantificación de ADN. Fluorecencia (1-40 muestras)	Análisis	15	2	30
Validación de ADN (1-48 muestras)	Análisis	33	1	33
Amplificación PCR primers universales y específicos(1-50 muestras)	Análisis	291	1	291
Visualización primers universales y específicos (1-50 muestras)	Análisis	30	1	30
			SubTotal	414

Cuadro 11. Materiales de Oficina

Rubro	Descripción	Precio Unitario	Cantidad	Total
Impresión y Empastado	Unidad	25	4	100
Suministros de oficina	Unidad	15	5	75
CD	Unidad	5	4	20
Publicación y Difusión		100	1	100
			Subtotal	295

Cuadro 12. Costo total

Rubro	Total
Tesista	3885.6
Reactivos	644.90
Materiales de laboratorio	277.20
Análisis Molecular	414
Materiales de oficina	295
SUBTOTAL	5516.7
Imprevistos (5%)	275.84
TOTAL	5792.54

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Adaskaveg, J. Hartin. R. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*. 87: 979-987.
- Afanador, L. Minz, D. Maymon, M. y Freeman, S. 2006. Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*. 93 (5): 579-587.
- Aivarado, L., García, I, Bermúdez. M., Leiva. M. 2008. Aplicación de la selección *in vitro* en el mejoramiento genético de la papa para la resistencia al tizón temprano. Instituto de Biotecnología de las plantas. Universidad María Abreu de las Villas. Villa Clara-Cuba.
- Alvarez, E. Ospina, C. Mejía, J. Llano, G. 2005. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. *Fitopatol. Colombiana* Vol. 28(1):1-8.
- Bosh, L. 1994. Flora neotropica. *Cyphomandra* (Solanaceae). New York botanical garden press on behalf of organization for flora neotropica. New York. USA. 175p.
- Brown, A. Sreenivasaprasad, S y Timmer, L. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*. 86: 523-527.
- Colombo, C. Second, G. Lozada, T. Charrier. A. 1998. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta*. Crantz) RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*. 105-113p.
- Contreras. C. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum spp.*, obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense*. Lam), tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis*. Juss), mango (*Mangifera indica*. L) y tallos de mora (*Rubus glaucus*. Benth) con síntomas de antracnosis. Trabajo de grado en microbiología agrícola y veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 115p.
- Duvick, D. 1999. Heterosis: Feeding People and Protecting Natural Resources In: The Genetics and Exploitation of heterosis in Crop. American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America. Inc. Madison Wisconsin, USA. p. 19-29
- Granados, 1988, citado por Viera, W. 2002. Evaluación de fungicidas *in vitro* y pruebas de resistencia de cinco variedades de Tomate de Árbol para antracnosis. Cutuglagua-Pichincha. Tesis de Ingeniería Agronómica. Universidad Central del Ecuador. 111p
- INIAP. (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) 2009. Memoria Taller de seguimiento y planificación estratégica de la fruticultura del Ecuador. Programa de Fruticultura. Cuenca. 25p.
- INIAP. (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) 2004. Informe técnico final. Proyecto IQ CV 008. Generación y difusión de alternativas tecnológicas para mejorar la productividad de tomate de árbol y babaco en la sierra ecuatoriana. INIAP-PROMSA. Quito. 138p.
- Kosky, R. 1998. Selección *in vitro* a enfermedades. Propagación y mejora genéticas de las plantas. IBP, Cuba. 25-44p.

- Ligarreto, G. 2001. Los recursos genéticos: Un acervo importante para el mejoramiento de la producción de papa. *Revista Corpoica* 2(1):12-17
- Lobo, M. Medina, C. Cardona, M. 2000. Resistencia de campo a la antracnosis de los frutos (*Colletotrichum gloeosporioides*) en tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* Cav. Sendt.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 53:1129-1142.
- Lozada, P. 2010. Evaluación del efecto de auxinas, citoquininas y brasinoesteroides sobre las fases de establecimiento y multiplicación *in vitro* de tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav). Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí-Ecuador. 128p.
- Lucas. K. Maggui, J. Yagual, M. 2010. Creación de una empresa de producción, comercialización y exportación de tomate de árbol en el área de Sangolquí, Provincia de Pichincha. Tesis de Ingeniería Comercial y Empresarial. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Economía y Negocios. Guayaquil-Ecuador. 140p.
- MAGAP/III CNA/SIGAGRO; INEC/ESPAC Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (2010). Información multimedia. Disponible en:
http://www.magap.gob.ec/sigagro/spr/spr_tomatearbol.htm
- Navarro, A. 2005. Determinación de una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación *in vitro* de doce ecotipos de ají y cuatro de tomate de árbol. Tesis Ingeniera Agrónoma. Universidad Técnica de Cotopaxi. Latacunga-Ecuador. 131p.
- Olmos, S; Luciani. G; Galdeano, E. 2008. Métodos de conservación y propagación de germoplasma. [En línea]. Consultado el 18 may. 2011. Disponible en:
www.biblioteca.org.ar/libros/150415.pdf
- Pérez. J. 1998. Mutagénesis *in vitro* en: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. IBP, Cuba. 297-326p.
- Proaño, D. 2008. Caracterización y selección de segregantes de cruzamientos inter específicos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) con resistencia a antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), y atributos agronómicos deseables evaluados en las provincias de Pichincha y Tungurahua. Tesis Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Cotopaxi. Carrera de Ciencias Agropecuarias, Ambientales y Forestales. Latacunga. 139p.
- Tapia, C. 2004. "Tomate de árbol, frutal promisorio para la diversificación del agro andino". Informe técnico, Convenio CORPOICA-INIAP-INIA-UCLA.

9. ANEXOS

ANEXO I

Desinfección del material (Simple Desinfección), descrito por Navarro, (2005)

Lavar los segmentos de tallo con agua corriente
Colocar jabón líquido y 5 gotas de povidin, agitar durante 15 minutos
Enjuagar con agua corriente
Colocar los explantes en una solución de Benomil y Carbendazim al 1% y agitar por 15 minutos
Enjuagar con agua corriente
Llevar a la cámara de flujo laminar
Colocar en una solución de cloro al 10% en agua destilada con 2 gotas de Tween por 10 minutos
Lavar con agua destilada estéril hasta eliminar totalmente el jabón

ANEXO II

Medios de micropropagación para tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav), descritos por Navarro, (2005).

Cuadro 13. Medio 1

Reactivo	Cantidad
Sales M&S	4,4 g/l
BAP 6Benzilamino purina	0.25mg/l
AG3 Ácido Giberélico	0.2mg/l
Pantotenato de Calcio	2mg/l
Sacarosa	30g/l
Phytigel	3.5 g/l

Cuadro 14. Medio 2

Reactivo	Cantidad
Sales M&S	4,4g/l
BAP 6Benzilamino purina	0,4mg/l
ANA Ácido naftalenacético	0,2mg/l
Ácido Giberélico (GA3)	0,6mg/l
Tiamina	0,4mg/l
Sacarosa	20 g/l
Phytigel	3.5 g/l

Adicionar en una probeta graduada 200ml de agua destilada y colocar en el agitador magnético.
Agregar los reactivos en las cantidades mencionadas
Aforar hasta 1000ml y ajustar el pH
El pH del medio se ajustará entre 5.6 y 5.7, utilizando para el efecto NaOH para subir y HCl para bajar pH, luego agregar el phytigel, posteriormente, se dispensará en tubos de ensayo la cantidad de 5ml, para finalizar el proceso se esterilizará en autoclave a 121°C y 15 PSI (1.5Kg cm⁻²) de presión durante 20 minutos.

ANEXO III

Escala arbitraria para evaluar la severidad del daño causado por *Colletotrichum spp.* (Granados, 1988, modificado, citado por Viera, 2002)

Nivel 1: Sin daño (sana); hojas y tallo vigorosos, sin necrosamiento o pudrición, tejido del sistema vascular del tallo sano. Explantos vigorosos.

Nivel 2: Daño ligero; hojas y tallo menos vigorosos con necrosamiento y pudrición ligera, tejido del sistema vascular del tallo poco afectado.

Nivel 3: Daño medio; proporción de hojas sanas mayor o igual que la proporción de hojas enfermas. Los daños se observan en cualquier parte del explante, tejido vascular afectado. Con síntomas ligeros de clorosis.

Nivel 4: Muy dañada; proporción de hojas necrosadas o podridas es mayor que la proporción de hojas sanas. El tejido vascular afectado. Explantos débiles, pequeños y cloróticos.

Nivel 5: Daño severo o total; necrosis o pudrición en casi todo el explante. Sistema vascular desintegrado. Explantos con marcada marchitez y pequeños. Clorosis.

ANEXO IV

Medios de Enraizamiento para tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav.), descritos por Benítez, (2012).

Cuadro 15. Medio 1

Reactivo	Cantidad
M&S básico con vitaminas	4,4 g/l
IBA (Ácido indolbutírico)	1.0mg/l
Sacarosa	30g/l
Phytigel	3.5 g/l

Cuadro 16. Medio 2

Reactivo	Cantidad
M&S básico con vitaminas	4,4 g/l
IBA (Ácido indolbutírico)	0.5mg/l
Sacarosa	30g/l
Phytigel	3.5 g/l

ANEXO V

Identificación Molecular del hongo *Colletotrichum spp.* (Afanador *et al* 2006; Brown *et al* 1996)

Extracción de ADN: Para la extracción de ADN se utilizará el protocolo de Colombo *et al*, (1998), además, se realizará un paso adicional, que consiste en liofilizar el hongo antes de proceder a la extracción.

Identificación Genética: Los aislados del hongo se identificarán taxonómicamente utilizando la técnica de PCR mediante la amplificación con primers universales de la región conservada del ADN ribosómico (ADNr) y el cual involucra el uso de dos cebadores o primers ITS (Adaskaveg, 1997). (Cuadro 16), los cuales se combinarán de la siguiente manera: ITS1-ITS4.

Cuadro 17. Secuencias de los cebadores universales ITS (secuencias internas conservadas)

Cebador Universal	Secuencia
ITS 1	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'
ITS 4	5' TCC CTT TCA ACA ATT TCA CG 3'

Además, se utilizarán los cebadores específicos CgInt y Calnt2, descritos en el cuadro 17 combinados con la secuencia-ITS 4 de la región conservada del gen 25/28S del ADNr. Se utilizará el protocolo de amplificación descrito por Álvarez *et al* (2005).

Cuadro 18. Secuencias de primers específicos para identificación de especies del género *Colletotrichum*

Cebador Especifico	Especie
CgInt: 5' GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG 3'	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Calnt 5' GGGGAAGCCTCTCGCGG 3'	<i>Colletotrichum acutatum</i>